

## 2. エイズ発症遅延に関わる CCR-5 遺伝子多型と末梢血単核球のサイトカイン産生能の検討

分担研究者 田代 真人 国立感染症研究所ウイルス製剤部部长

研究要旨 日本の HIV 感染長期未発症者を調べ、エイズ発症遅延にはケモカインレセプターの変異や細胞性免疫能を高めるサイトカイン産生能が関係していることが明らかになった。

研究協力者 照沼裕 山梨医科大学微生物学講座；岡田晴恵 国立感染症研究所ウイルス製剤部

(倫理面への配慮)

採血の際には担当医から患者への説明と研究への協力の意志を確認し、また、希望する患者には検査結果を担当医を通してフィードバックしている。

### A. 研究目的

抗 HIV 剤を使用せず 13 年以上無症候で CD4 数が  $500/\mu\text{l}$  以上である日本の HIV 感染長期未発症者についてケモカインレセプター CCR-5 の遺伝子多型や末梢血単核球 (PBMC) でのサイトカイン産生能を調べることにより、長期未発症を誘導するために重要な宿主側の因子について検討する。

### B. 研究方法

検討対象は HIV-1 に感染した日本の血友病患者で、長期未発症者 9 例 (A 群)、3 年前までは長期未発症だったが現在は CD4 数が 200-400 になってしまった 8 例 (B 群)、CD4 数は 400 以上で抗 HIV 剤を使用している 9 例 (C 群)、CD4 数が 200-400 で抗 HIV 剤を使用している 10 例 (D 群)、HIV-1 抗体陰性で血友病でない健康人 19 例 (E 群)。検討項目は CCR-5 の調節領域の 59653 番目の塩基がホモまたはヘテロで thymine (T) である割合、Sac または PHA で刺激した PBMC の培養上清中での IL-12 p-70 (pg/ml) または IFN- $\gamma$  (pg/ml) の濃度。

### C. 研究結果

CCR-5 の調節領域の 59653 番目の塩基がホモまたはヘテロで thymine (T) である割合は A 群 78%、B 群 63%、C 群 44%、D 群 40%、E 群 37% であり、長期未発症者でより高い割合で認められた (図 1)。また、IL-12 の産生能 (pg/ml) は A 群で  $39 \pm 27$ 、B-D 群で  $11 \pm 11$ 、E 群で  $17 \pm 10$ 、IFN- $\gamma$  の産生能 (pg/ml) は A 群で  $1337 \pm 1801$ 、B-D 群で  $290 \pm 490$ 、E 群で  $234 \pm 232$  であり、長期未発症者で IL-12 や IFN- $\gamma$  の産生能が高いことが認められた (図 2、図 3)。

### D. 考察

今回の結果では、長期未発症者の誘導にはケモカインレセプターの変異によるウイルスの侵入障害や細胞性免疫能を高めるサイトカイン産生能などが重要である可能性が示唆された。

この研究は、感染時期や人種が均一な群で比較をおこなっており、デザインにすぐれた

研究であり、長期未発症で IL-12 や IFN- $\gamma$  の産生能が高いということについてはこれまで報告がなく、学術的・国際的にはもちろん、今後の新しい HIV 感染者の治療法の方向を示唆するという点で社会的にも重要な意義がある研究と考えられた。

尚、本研究は静岡こども病院三間屋純一、荻窪病院花房秀次、山梨医科大学伊藤正彦、楊栄閣との共同研究である。

## E. 結論

日本の HIV 感染長期未発症者についてケモカインレセプター CCR-5 の遺伝子多型と PBMC でのサイトカイン産生能を調べ、エイズ発症遅延にはケモカインレセプターの変異や細胞性免疫能を高めるサイトカイン産生能が関係していることを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

He, L., Terunuma, H., Tanabe, F. et al.: IL-18 and IL-1  $\beta$  productions are decreased in HIV-1-seropositive haemo-philiacs but not in HIV-1-seropositive non-haemophiliacs. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16: 345-353, 2000.

照沼裕, 沼崎義夫: ザンビアにおけるエイズ治療の足掛かり. *化学療法の領域* 16: 483-488, 2000.

Sugiura, Y., Terunuma, H., Yamamoto, T. et al.: Host immune profiles and genotyping analysis of HIV-1 among Japanese hemophiliac patients. *Fukushima Journal of Medical Science* 45: 53-62, 1999.

Fleming, A. F., Terunuma, H., Tembo, C., Mantina, H.: Leukaemias in Zambia. *Leukemia* 13: 1292-1293, 1999.

### 2. 学会発表

照沼裕他:HIV-1長期未発症者でのCCR-5とSDF-1の遺伝子多型の検討. 第47回日本ウイルス学会, 1999年11月横浜.

照沼裕他:HIV-1長期未発症者でのCCR-5とSDF-1の遺伝子多型およびケモカインレセプター表出細胞の割合の検討. 第13回日本ウイルス学会, 1999年12月東京.

Terunuma, H., Matondo, P., Mulundu, G. et al.: Immune status of HIV-infected patients with Kaposi's sarcoma in an African KS endemic area. 11th International Conference on AIDS and STDs in Africa (Lusaka) Sep 1999.

図 1

CCR-5 遺伝子の59653 番目の塩基の多型性

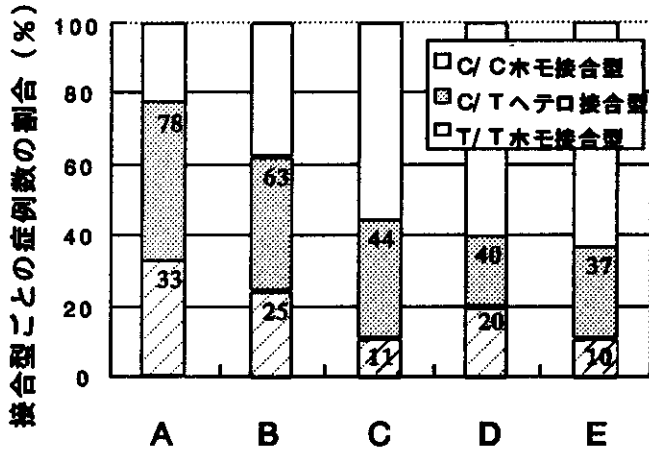


図 2

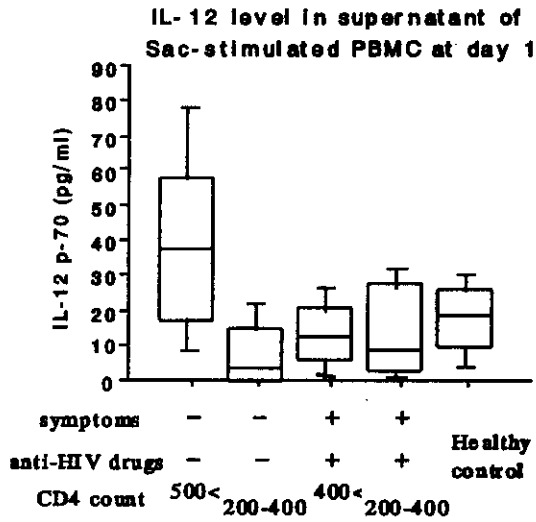
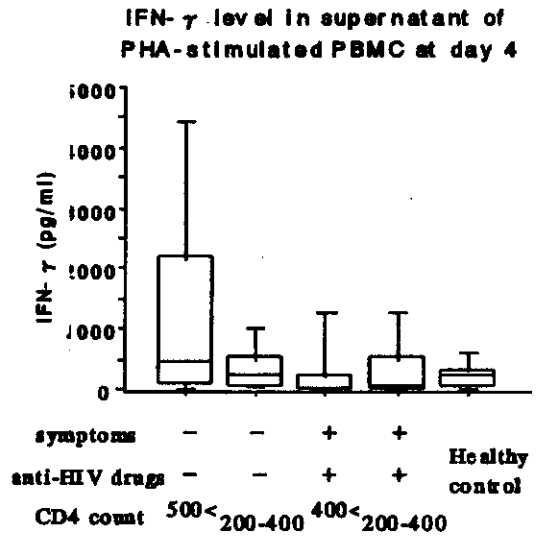


図 3



### 3. HIVの感染と複製に関与する細胞性プロテアーゼ群の機能解析

分担研究者 木戸 博 (徳島大学分子酵素学研究センター)

研究協力者 矢野仁康, 若林英樹, 楊兵 (徳島大学分子酵素学研究センター)

#### 研究要旨

HIV易感染細胞やPHAを処理したヒト末梢血リンパ球では、tryptase TL<sub>2</sub>(TL<sub>2</sub>)の発現が著明に増加している。昨年までの研究で、細胞膜上のTL<sub>2</sub>のプロテアーゼ活性を阻害する細胞膜非透過型阻害剤の、HIV増殖阻止作用を示したが、本年度の研究ではNucleoside diphosphate Kinase活性を合せ持つ細胞質内のTL<sub>2</sub>がtranslation調節因子のmTORと結合する事を明らかにし、T細胞の活性化に関与する事が示唆された。T細胞の主要なgp160プロセシングプロテアーゼの酵素的性状解析から、ミクロプラスミンに類似したプロテアーゼである事が明かとなった。その阻害剤の投与により細胞内でのgp160のプロセシングと、感染細胞の合胞体形成が抑制された。

#### A. 研究目的

HIV-1の感染と複製過程は、多くの細胞性因子との相互作用の結果である。我々はウイルスの侵入と増殖に関与する細胞性プロテアーゼ、tryptase TL<sub>2</sub>(TL<sub>2</sub>)と、HIV-1外膜糖蛋白前駆体(gp160)の複製に関与するプロセシングプロテアーゼを焦点にその作用機構を解析し、その結果を基にウイルス増殖阻害剤の開発を目的とする研究を推行了。TL<sub>2</sub>はこれまでの研究から少なくとも6種のアイソマーがあり、細胞膜に結合するTL<sub>2</sub>は、HIV-1 gp120をV3領域で限定的に分解し、この分解を阻害することでウイルスの複製が抑制されることを見出している。本年度の研究ではさらに、細胞質内に局在するTL<sub>2</sub>がプロテアーゼ活性と共に分子シャペロン様のNucleoside diphosphate kinase活性を持つことから、細胞質内のTL<sub>2</sub>の機能解析を試みた。一方HIV-1外膜糖蛋白前駆体gp160のプロセシング酵素の性状が解明されたことから、特にその阻害剤の検討を行った。

#### B. 研究方法

##### ①材量, 細胞

TL<sub>2</sub>と HIV-1 gp160のプロセシングプロテアーゼ

は、Molt-4,clone 8細胞より精製して用いた。細胞内のTL<sub>2</sub>の役割を解析するため、pervanadateによるT細胞内のシグナル伝達系が確立しているJurkat細胞を用いた。mTOR遺伝子とTL<sub>2</sub>の遺伝子導入にはCOS-7細胞を用いた。またHIV-1 gp160 env遺伝子を組み込んだワクチニアウイルスvPE16をMolt-4,clone 8, JurkatおよびEoL-3細胞に感染させ、gp160のプロセシングと、合胞体形成に対するプロテアーゼインヒビターの効果を検討した。なおFurinインヒビターのdec-RVCR-cmkとその誘導体は、Marburg大学、ウイルス研究所のKlenk博士の供与による。

##### ②TL<sub>2</sub>とmTORの相互作用の検討

細胞質内でのTL<sub>2</sub>とmTORとの相互作用の検討は、Pervanadateによる細胞刺激の有無の条件下で、細胞質分画のTL<sub>2</sub>、あるいはmTORを免疫沈降したときに共沈してくる蛋白質の解析により測定した。

##### ③gp160プロセシングプロテアーゼインヒビターのスクリーニングと、細胞培養系での合胞体形成の抑制

gp160プロセシングプロテアーゼインヒビターのスクリーニングは、Molt-4.clone8細胞より精製した酵素を用い、Boc-LKR-MCAを基質としてインヒビ

ターのスクリーニングを行った。一方培養細胞レベルでのgp160プロセッシングプロテアーゼインヒビターの阻害効果の検定は、ワクチニアウイルスvPE16をHeLa細胞に感染させるさいに、種々のインヒビターを投与することで、細胞内でのgp160のプロセッシング抑制効果を検討した。一方、gp160の成熟阻害の結果生ずる、ウイルス複製の阻害、あるいは感染サイクルの阻害を、未感染Jurkat細胞にvPE16を感染させたEoL-3細胞を加えることによって生ずる合胞体形成の阻止効果から評価した。

## C. 研究結果

### ①細胞質内のTL2は、T細胞の活性化と共にトランスレーション促進因子のmTORと結合する。

TL2はT細胞の膜表面に局在する以外に、その大部分は細胞質にも局在する。そこで細胞質内のTL2の生理的役割の解析を試みた。一般にHIV-1は、活性化されたT細胞でよく増殖することが知られている。そこでPHAによって活性化されたヒトのTリンパ球でのTL2の発現を検討した。ヒトのTリンパ球には、6種類見出されているアイソマーの中で、特に $\tau$ アイソマーが多く含まれていることを我々はすでに明らかにしている。TL2 $\tau$ は、PHA処理後の時間とともにその発現が著明増加することが明かとなった。またTL2 $\tau$ のmRNAも同様に著明に増加していた。

PHA処理によって増加するTL2 $\tau$ の生理的意義を解明するため、TL2 $\tau$ と相互作用を示す細胞質内の蛋白質を、免疫沈降法によって検索した。これまでの研究から、Jurkat細胞をpervanadateで処理することにより、T細胞抗原でT細胞を刺激する場合と同様な細胞内情報伝達が引き起こされることが明かとなっている。そこでJurkat細胞をpervanadateによって刺激したさいに、引き起こされるTL2 $\tau$ の細胞内での変化を検討した。図1に示すように、TL2 $\tau$ は、pervanadateによる刺激を受けることによりmTORと結合することが、TL2の抗体と、mTORに対する抗体による免疫沈降で確認された。mTORは、これまでの

研究から免疫抑制剤のRapamycinやFK506の結合蛋白質(FKBP12)の標的蛋白質で、C末端側にPI3 kinase様の領域を持つプロテインキナーゼであることが判明している。そこでmTORの示すプロテインキナーゼの活性中心の変異体、mTOR D23257Eと、FKBP12との結合部位を欠く変異体、mTOR $\Delta$ 44-1336のTL2 $\tau$ との相互作用を検討した。この実験には、CHO細胞にTL2 $\tau$ 遺伝子と各種の変異体を含むmTOR遺伝子を導入して、mTORとTL2 $\tau$ との相互作用を免疫沈降法にて測定した。図2に示すようにPervanadate処理によってmTORの自己リン酸化が促進されると共に、TL2 $\tau$ とmTORとの結合が認められた。しかし、プロテインキナーゼとしての活性中心を変異させたmTOR D23257Eでは自己リン酸化が全く認められなくなると共に、TL2 $\tau$ との結合量も激減した。しかしFKBP12との結合領域を欠くmTOR $\Delta$ 44-1336では、野生型mTORと同様にTL2 $\tau$ と結合したことから、mTORのプロテインキナーゼ領域を含むC末端側とTL2 $\tau$ が結合することが明かとなった。

### ②HIV-1 gp160のプロセッシングプロテアーゼ阻害剤の効果の検討

昨年までの研究から、T細胞内のHIV-1 gp160のプロセッシングプロテアーゼは、Ca<sup>++</sup>非要求性のプロテアーゼでその酵素学的性質は、ミクロプラスミンに類似したトリプシン型酵素であることが明かとなっている。本年度の研究では、その阻害剤のスクリーニングと、細胞培養系での阻害剤の効果を検討した。表1にMolt-4, clone 8細胞の膜分画より精製したHIV-1 gp160のプロセッシング酵素の阻害剤の特異性を示す。DFPが効果のあることからセリン性のプロテアーゼであることが解る。一方Furinの特異的阻害剤とこれまでに言われてきたdec-RVKR-cmkは、最も強い阻害作用を示した。その他Aprotinin, HI-30が阻害効果を示し、これ等以外に還元剤のDTT, 2-mercaptoethanolにも強い阻害効果が認められた。表1に示された阻害剤の中で、細胞膜を通過しうる阻害剤は、今のと

ころ低分子還元剤とDFPのみである。そこでワクチニアウイルスvPE16を処理したHeLa細胞内でのgp160のプロセシングに、これ等の低分子還元剤のプロセシングの阻害作用があるか否かを検討した。その結果2mM 2-mercaptoethanol, 20mM L-Cysteine, 10mM N-acetyl L-cysteineにgp160のプロセシング阻害効果を認めた。gp160のプロセシングが阻害されると細胞膜上にgp120が輸送されなくなり、その結果ウイルスの複製が止まると共に合胞体の形成が阻止され、ウイルス感染の広がりが障害されることが予想される。そこで、表1に示す阻害剤の合胞体形成に対する効果を検討した。図3に示すように、細胞膜通過型の低分子阻害剤のDFP, DTT, N-acetyl-L-cysteinは、いずれもJurkat細胞の合胞体形成を阻止した。

#### D. 考察

細胞膜非通過型のTL<sub>2</sub>の阻害剤で、HIV-1の増殖と複製が抑制されるという昨年までの結果から、細胞膜上のTL<sub>2</sub>は、ウイルスの侵入プロセスに関与していることが推定された。一方TL<sub>2</sub>は、細胞膜以外にも細胞質に多量に存在しており、プロテアーゼとしての作用以外に、リン酸基の転移反応を触媒するNDPキナーゼ様活性も合わせ持つことがすでに分かっている。本年度の研究で、TL<sub>2</sub>はT細胞の活性化に伴ってPI3キナーゼに類似したtranslation活性化の因子のmTOR結合することから、T細胞の活性化に関与するシグナル伝達にそのリン酸基転移反応を介して、作用していると推定された。以上のデータを基に今後HIV-1感染に伴うTL<sub>2</sub>とmTORとの相互作用を明らかにしてゆく。

一方HIV-1 gp160前駆体蛋白を成熟型にプロセスする酵素が、ミクロプラスミンに類似した基質特異性を持つCa<sup>++</sup>非要求性のプロテアーゼであることがこれまで明らかになっている。本年度の研究では、その阻害剤を検索し、細胞内でのgp160のプロセシングが阻害されることにより、HIV-1感染の広がりを

阻止できるか否かを検討した。細胞膜を通過できるプロセシングプロテアーゼの特異的低分子インヒビターはまだ見つかっていないため、非特異的であるがgp160のプロセシングを阻害するDFP, N-acetyl-L-cystein, L-cystein, DTTなどの阻害効果を検討した。これ等のインヒビターは、いずれも細胞内でのgp160の成熟を阻害すると共に、gp120による合胞体形成を抑制した。以上のことから、gp160のプロセシング阻害による抗エイズ薬の開発が可能な事を明らかにした。

#### E. 結論

細胞膜上のTL<sub>2</sub>は、HIV-1 gp120のV3領域を切断してHIV-1の細胞内侵入を促進するが、細胞質内のTL<sub>2</sub>は、活性型T細胞においてtranslationを促進因子のmTORと結合することが明かとなった。なおこの作用には、リン酸基の転移を触媒するTL<sub>2</sub>の持つもう1つの作用、シャペロン型NDPキナーゼ活性が関与していると推定している。

一方HIV-1 gp160の成熟に関与するプロセシングプロテアーゼの阻害剤を用いることで、細胞内でのgp160の成熟の阻害と、合胞体形成の阻止が起きることが示され、抗HIV薬を考える1つの標的になることが示された。

#### F. 研究発表

[論文発表]

- 1.Kido,H., Chen,Y., Murakami,M., Beppu,Y. and Towatari,T. : Cellular proteinase and viral infection ; influenza virus, Sendai virus and HIV-1. Proteases of infectious agents. (Ben M.Dunn ed.) p.205-217(1999) Academic Press, San Diego
- 2.Kido,H., Murakami, M., Oba, K., Chen, Y. and Towatari, T. : Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. Mol.Cell., 9(3), 235-244 (1999)

3. Yano, M., Mori, S. and Kido, H. : Intrinsic nucleoside diphosphate kinase-like activity is a novel function of the 20S proteasome. *J.Biol.Chem.*, 274(48) 34375-34382 (1999)

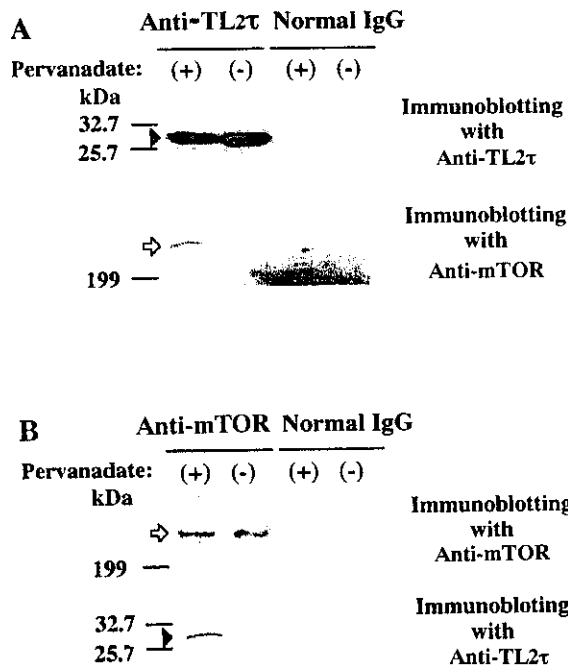
4. Inoue, M., Isobe, M., Itoyama, T. and Kido, H. : Structural analysis of esp-1 gene (PRSS21). *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 266(2), 562-568 (1999)

5. Mori, H., Inoue, M., Yano, M., Wakabayashi, H. and Kido, H. : 14-3-3 $\tau$  associates with a translational control factor FKBP12-rapamycin-associated protein in T cells after stimulation by pervanadate. *FEBS Lett.*, 467(1), 61-64 (2000)

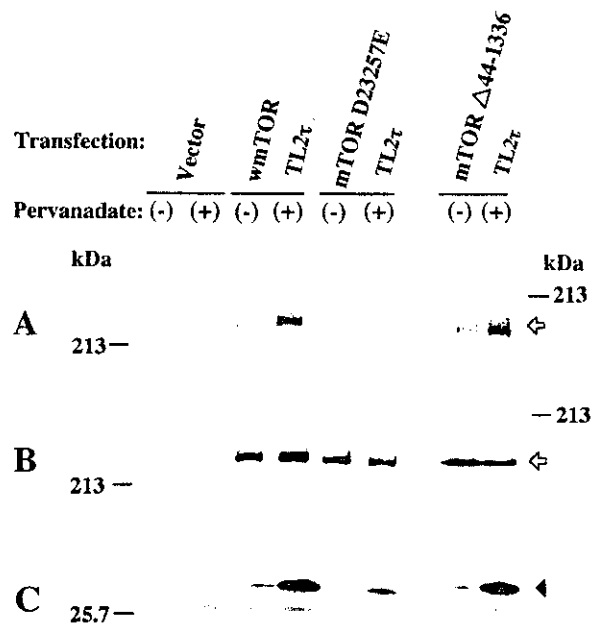
[学会発表]

1. 若林英樹、前田雅広、藤原良明、崔萍、楊兵、矢野仁康、木戸博：エイズ脳症と14-3-3蛋白質、第72回日本生化学会大会、1999年10月6-9日（横浜）

2. 矢野仁康、森幸恵、木戸博：20Sプロテアソームの新しい機能、内在性シャペロン型ヌクレオシド2リン酸キナーゼ様活性の発見。第72回日本生化学会大会、1999年10月6-9日（横浜）



☒ 1 Association of mTOR with TL2 $\tau$  in human T-cells. Jurkat cell lysates of unstimulated cells (-) or cells after stimulation by pervanadate (+) were immunoprecipitated with anti-TL2 $\tau$  or normal control IgG (A), and anti-mTOR or normal goat IgG (B). The immunoprecipitates were resolved by 4-20% gradient SDS-PAGE and then transferred to PVDF membranes. The blots were probed with anti-mTOR and anti-TL2 $\tau$  antibodies, and visualized with ECL. Arrows and arrowheads indicate FRAP and TL2 $\tau$ , respectively.



☒ 2 Autophosphorylation of mTOR and its association with TL2 $\tau$  after stimulation by pervanadate. COS-7 cells were transiently co-transfected with pBJ5-FLAG-tagged wild type mTOR (wmTOR), mTOR variants D2357E and  $\Delta$ 44-1336, or the empty vector (each 7.5  $\mu$ g of DNA), and pcDL-SRa296-TL2 $\tau$  (5  $\mu$ g of DNA), for 48 h. After transfection, the cells were stimulated with 100  $\mu$ M pervanadate for 10 min. Cell lysates of the unstimulated (-) or pervanadate stimulated (+) cells were immunoprecipitated with anti-FLAG M2 affinity gel. The immunoprecipitates were incubated with [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP for 20 min at 30°C, and the reactions were terminated by adding 3x SDS sample buffer. The reaction products were resolved by 4-20% gradient SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes, and then  $^{32}$ P incorporation into wmTOR and its mutants, D2357E and  $\Delta$ 44-1336, was detected with a BAS1500 (A). FLAG-tagged wmTOR, D2357E and  $\Delta$ 44-1336, in the immunoprecipitates (B) and TL2 $\tau$  in the immunoprecipitates (C) were quantified by immunoblotting with anti-FLAG and TL2 $\tau$  antibodies, respectively. Arrows indicate wmTOR and mTOR variants, and arrowhead indicates TL2 $\tau$ .



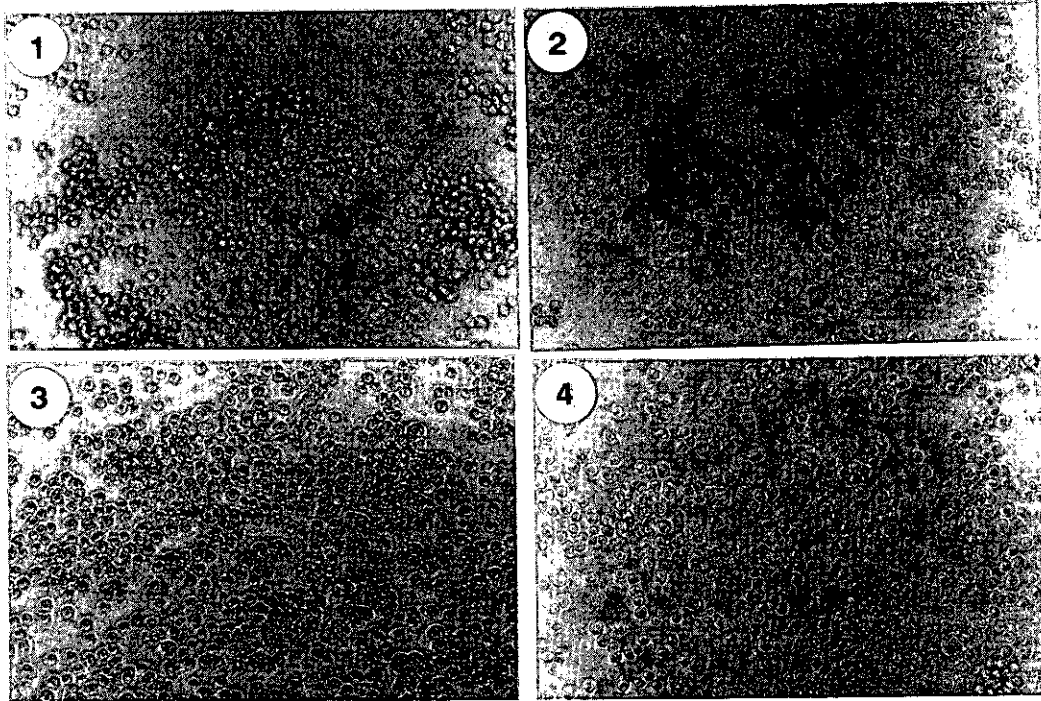


图3 Inhibition of syncytium formation by inhibitors of VEM. EoL-3 cells infected with vPE16 were cocultured with Jurkat cells in the presence or absence of inhibitors of VEM. After incubation for 24 h, syncytium formation was examined under an inverted microscope (magnification  $\times 200$ ). Addition: 1, none; 2, 2.5 mM DFP; 3, 0.5 mM dithiothreitol; 4, 10 mM *N*-acetyl L-cysteine.

表1 Inhibitor spectrum of VEM for gp160 processing *in vitro*.

Addition	Final concentration	Inhibition of cleavage <sup>a</sup> (%)
None		0
DFP	1 mM	91.3
dec-RVKR-cmk	1 $\mu$ M	31.4
	10 $\mu$ M	100
dec-FAKR-cmk	10 $\mu$ M	1.6
Aprotinin	1 $\mu$ M	88.9
	10 $\mu$ M	98.4
Leupeptin	10 $\mu$ M	0.3
Antipain	10 $\mu$ M	0
HI-30	10 $\mu$ M	82.9
Chymostatin	10 $\mu$ M	5.0
Pepstatin	10 $\mu$ M	1.5
Elastatinal	10 $\mu$ M	3.8
E-64c	10 $\mu$ M	31.9
Phosphoramidon	10 $\mu$ M	8.2
EDTA	2 mM	0
EGTA	2 mM	0
2-Mercaptoethanol	10 mM	100
DL-Dithiothreitol	1 mM	83.7
	10 mM	100
L-Cysteine	10 mM	26
	20 mM	78
<i>N</i> -Acetyl L-cysteine	10 mM	82

<sup>a</sup>Percentage cleavage inhibition was calculated as described in "MATERIALS AND METHODS."

## 4. 糖脂質によるHIV-1感染増強機構の解析

分担研究者 原田 信 志 (熊本大学医学部感染防御)

研究要旨 植物由来の糖脂質であるカプシアノサイドを用いて、HIV-1の細胞への吸着侵入機構を明らかにすることを試みた。分子量が大きく糖鎖の短いカプシアノサイドGのHIV-1感染修飾効果が最も大きかった。特に、細胞をカプシアノサイドGで前処理すると、X4タイプのウイルスの感染を増強した。このウイルスのタイプ特異的感染増強効果は、カプシアノサイドGによる細胞膜表面のCD4やCXCR4の発現を増強させるためでもウイルスの吸着量を増加させるためでもなかった。カプシアノサイドGはCD4とCXCR4の共集合を選択的に誘導した。この現象がX4ウイルスの感染を増強したと考えられた。

### A. 研究目的

T細胞指向性HIV-1(X4)のレセプターはCD4とCXCR4であり、マクロファージ指向性ウイルス(R5)はレセプターとしてCD4とCCR5を使用する。両指向性HIV-1(R5X4)はCXCR4とCCR5を共に利用し感染を成立させる。そのほか、神経細胞や腸上皮細胞ではガラクトシルセラマイドがHIV-1感染のレセプターとして利用されている。なぜHIV-1はこのように複雑なレセプター系を使用しているのか、このような多様なレセプターが感染成立にどのように機能的に関連しているのか、疑問は多い。

我々はこれまで二つのアプローチでウイルスのレセプターと感染の問題を追究してきた。その一つはCCR5のリガンドでありR5ウイルスの感染を阻止するMIP-1aに耐性のウイルスを作製し、その変異部位を解析することにより、ウイルス側のレセプター反応部位を決定する事である。もう一つの方法として、様々な糖脂質を使いHIV-1感染の修飾(抑制あるいは促進)を解析することを試みた。

今回、植物由来の糖脂質であるカプシアノサイドがX4ウイルスの感染のみを特異的に増強することを見出し、その増強機構を解析した。

### B. 研究方法

1. 細胞とウイルス：ウイルスはX4、R5、R5X4として、それぞれLAI、JR-FL、KMT株を使用した。また、pseudotyped virusはNL-43、JR-FL、KMTそれぞれのEnvを持ち、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして保持したものを作製した。細胞はCD4とCCR5が陽性でHeLa細胞由来であるMAGI/CCR5細胞を使った。また、GFP遺伝子を持ったGHOST細胞にHIV-1のレセプ

ターを発現させたものも感染に使用した。

2. 糖脂質と試薬：CD4、CXCR4、CCR5を認識するモノクローナル抗体を使用した。糖脂質は植物由来のカプシアノサイドを用いた。このカプシアノサイドにはmonomericなIIとXI、エステル結合したGとAがある (Fig.1)。
3. 感染細胞の同定：HIV-1のレセプターを介した感染系では、MAGI/CCR5細胞を用いて感染細胞をX-galで染色した。GHOST細胞の感染ではFACSを使用し感染細胞を定量した。
4. HIVの定量：HIVのコア蛋白であるp24の量をELISAで測定した。
5. 細胞表面ウイルスレセプターの解析：CD4、CXCR4、CCR5に対するモノクローナル抗体を使用し細胞を染色した。レセプターの解析はFACSあるいは二重染色の場合は共焦点顕微鏡で行った。

### C. 研究結果

1. 4種類のカプシアノサイド(Fig.1)のHIV-1感染に与える影響を調べた。分子量が大きく糖鎖の短いカプシアノサイドGの作用が最も大きかった(Table 1)。カプシアノサイドGをX4ウイルス感染と同時にMAGI/CCR5細胞に作用させると、約91%の感染の抑制が認められた。一方、細胞をカプシアノサイドGで前処理すれば、逆に8.2倍の感染増強が見られた。
2. この感染増強効果をさらに調べた。MAGI/CCR5細胞をカプシアノサイドGで処理し、X4、R5、R5X4それぞれのウイルスを感染させた。2日後、感染細胞を数えた。400µg/mlのカプシアノサイドGではX4ウイルスの感染は約8倍

増強した。しかしながら、R5やR5X4ウイルスではこのような強い感染の促進は認められなかった (Fig.2)。同様の結果は、pseudotyped virusを用いた実験でも得られた。つまり、カプシアノサイドGで前処理したMAGI/CCR5細胞で、X4ウイルスのEnvを発現したウイルスの感染でのみ増強効果が見られた。

3. カプシアノサイドGの細胞レセプターへの効果をさらに調べるため、CXCR4あるいはCCR5を発現したGHOST細胞と両指向性ウイルスであるKMT株を用いて感染実験を行った。KMTウイルスのカプシアノサイドGによる感染増強はCXCR4を発現したGHOST細胞で見られ、CCR5を発現した細胞では認められなかった。
4. カプシアノサイドG処理では細胞表面マーカーであるCD4、CXCR4、CCR5の発現に差が認められなかった。また、ウイルスの吸着量にも影響を与えなかった。
5. カプシアノサイドGで処理した細胞を二重染色し共焦点顕微鏡で観察すると、CD4とCXCR4との共集合とcappingが16%の細胞で観察された。しかし、CD4とCCR5との共集合は認められなかった (Table 2)。

#### D. 考 察

植物由来の糖脂質であるカプシアノサイドのHIV-1感染に与える作用を調べた。まず、分子量が大きく糖鎖が短いカプシアノサイドG (Fig.1)のHIV-1感染における修飾効果が最も大きかった。おそらく他のカプシアノサイドに比べて疎水性が高いこの物質の性質 (脂質二重膜への親和性が強い) が、HIV-1感染への効果の差となったのであろう。また、他の様々な糖脂質も同様であるが、ウイルス感染と同時にこの糖脂質を作用させるとHIV-1感染の抑制が見られ、細胞を前処置しウイルスを感染させると感染の増強が認められた (Table 1)。この理由はまだはっきりわかっていない。我々はこのカプシアノサイドGのHIV-1感染増強効果の機序を追究した。

このカプシアノサイドGの大きな特徴はこの糖脂質がHIV-1タイプ特異的效果を持っていることである (Fig.2)。MAGI/CCR5細胞ではT細胞指向性であるX4ウイルスの感染を選択的に増強した。また、様々なレセプターを発現したGHOST細胞への両指向性ウイルスであるKMTの感染では、CXCR4を発現した細胞でのKMTウイルスの感染が増強された。これらの実験結果から、カプシアノサイドGは細胞膜

上のCD4とCXCR4に何らかの作用をしているのであろうと考えられた。

事実、カプシアノサイドG処理細胞ではHIV-1の吸着には影響を与えず、また、CD4、CXCR4、CCR5などウイルスレセプターの発現を増強もしなかった。ただ、CD4とCXCR4の共集合とcappingの現象が認められ、この作用もCD4とCXCR4に特異的なものであった (Table 2)。このことから、カプシアノサイドGによるX4ウイルス特異的感染増強作用は、CD4とCXCR4とが細胞膜表面で共集合するためと思われた。このように細胞膜上での分子の動きが、ウイルスの感染を左右することを示した。

カプシアノサイドGがなぜCD4とCXCR4との共集合とcappingを誘導するか、まだわかっていない。しかし、4℃で細胞を処理するとこの現象が認められないことから、膜の流動性が関与していると思われた。これらカプシアノサイドはtight-junctional permeabilityを増加させること、また、GアクチンやFアクチンの組成を変えることなどが報告されている。しかし、この作用はCD4とCXCR4への特異性を説明できない。一つの仮説として、このカプシアノサイドGがCD4とCXCR4に選択的に結合し、架橋反応的に作用する。シグナルと細胞骨格筋への作用が誘起され膜の流動性も高まると考えられる。その結果、CD4とCXCR4との共集合とcappingが起こるのではないかと思われた。

このCD4とCXCR4の共集合とcappingとがカプシアノサイドGのX4ウイルスの感染増強だけに限られた現象なのか、あるいは、通常のHIV-1の感染時にも起こっている現象なのか追求すべきであろう。HIV-1のgp120を用いた実験を行うとCD4とCXCR4とがcolocalizeしたという報告がある。今後、ウイルス粒子を用いた系でこの現象を確かめる必要があると思われた。また、膜の流動性を低める何らかの薬剤があれば、このような物質のHIV-1感染抑制作用を調べることも重要だと考えられる。

#### E. 結 論

分子量が大きく糖鎖の短いカプシアノサイドGはHIV-1のX4ウイルス特異的にその感染を増強した。この現象はカプシアノサイドGが細胞のCD4とCXCR4との共集合とcappingとを選択的に誘導したためと思われた。細胞特に膜表面の分子の移動と分布がその分子の関与するウイルスの感染を左右することを示した。

## F. 研究発表

### 〔論文発表〕

1. Folks, T. and Harada, S.: *Virology, Overview. AIDS*, 13 (suppl A), S1-S3 (1999).
2. Kibayashi, K., Ng'walali, P.M., Mbonde, M.P., Makata, A. M., Mwakagile, D., Harada, S., Kitinya, J.N. and Tsunenari, S.: *Neuropathology of human immunodeficiency virus 1 infection. Significance of studying in forensic autopsy cases at Dar es Salaam, Tanzania. Arch. Pathol. Lab. Med.*, 123, 519-523 (1999).
3. Harada, S. and Maeda, Y.: *Chemically induced infection of CD4-negative HeLa cells with HIV-1. Microbiol. Immunol.*, 43, 1077-1086 (1999).
4. Maeda, Y., Foda, M., Matsushita, S. and Harada, S.: *Involvement of both the V2 and V3 regions of the CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope in reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ . J. Virol.*, 74, 1787-1793 (2000).

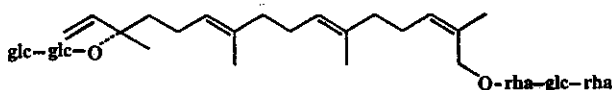
### 〔学会発表〕

5. Mohamed Foda, 前田洋助, 原田信志; HIVのCCR8利用におけるHIV-1 env領域のV1/V2、V3の役割、第47回日本ウイルス学会総会、1999年11月、横浜。
6. 遊佐敬介, Matthias Bartelmann, 原田信志; HIV-1プロテアーゼCys95の混合変異ウイルスの作製、第47回日本ウイルス学会総会、1999年11月、横浜。
7. 前田洋助, Mohamed Foda, 原田信志; HIVのコレセプター利用におけるエンベロープのV1/V2、V3領域の役割、第13回日本エイズ学会総会、1999年12月、東京。
8. 長尾和彦, 宋 薇, 前田洋助, 原田信志; 糖脂質 (ファティピラシンA1) によるHIV-1の感染増強、第13回日本エイズ学会総会、1999年12月、東京。
9. 宋 薇, 長尾和彦, 前田洋助, 原田信志; Effect of capsianoside, a diterpene glycoside, on HIV-1 infection、第13回日本エイズ学会総会、1999年12月、東京。

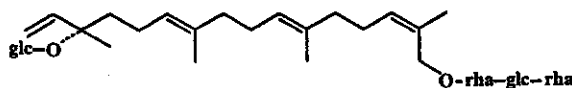
10. 遊佐敬介, Matthias Bartelmann, 原田信志; HIV-1プロテアーゼCys95混合変異ウイルスの作製、第13回日本エイズ学会総会、1999年12月、東京。

☒ 1

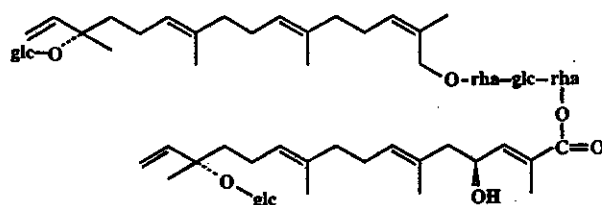
Capsianoside II (TAKL-1)  
MW: 1084



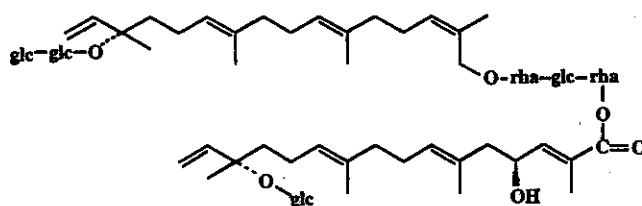
Capsianoside XI (TAKL-2)  
MW: 922



Capsianoside G (TAKL-5)  
MW: 1420



Capsianoside A (TAKL-7)  
MW: 1564



## Structure of capsianosides

表 1

Effects of Capsianosides on HIV Infection of MAGI/CCR5 Cells

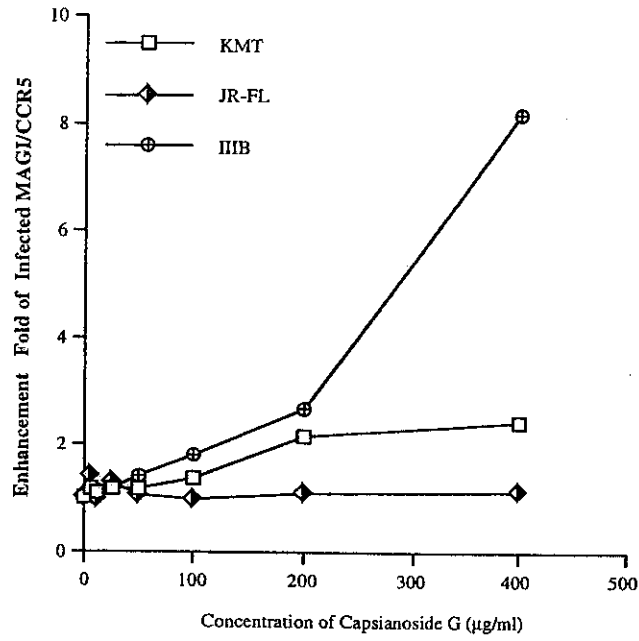
(T-tropic Virus -HIV/IIIB)

Compounds	Compounds + virus *(% of control)	Compound first**(% of control)
Capsianoside G	34 / 380 ( 9) ↓↓	533 / 65 (820) ↑↑
Capsianoside A	164 / 380 (43) ↓	184 / 90 (204) ↑
Capsianoside XI	177 / 226 (78)	136 / 91 (150)
Capsianoside II	138 / 226 (61)	158 / 110 (144)

\* Treatment of HIV/IIIB with the Compounds at RT for 30 min and then the mixture was used for infection of MAGI/CCR5 cells.

\*\* MAGI/CCR5 cells were treated with the compounds for 1hr at 37°C before infection of HIV/IIIB.

图 2



Effects of Capsianoside G on Different HIV Strains Infection

表 2

Co-localization of CD4 and CXCR4 on MAGI/CCR5 cells by Capsianoside G

Co-localization of:	% Co-localized cells treated with Capsianoside G	
	-	+
CD4/CXCR4	1.5	15.7
CD4/CCR5	0.9	1.0

## 5. HIVの病原性遺伝子Nefの機能を制御する宿主およびウイルス側因子の解析

分担研究者	松田道行	国立国際医療センター研究所臨床病理研究部
共同研究者	飛梅 実	国立国際医療センター研究所臨床病理研究部
	望月 直樹	同上
	巽 正志	国立感染症研究所獣医科学部

**研究要旨** 病原性遺伝子Nefに対する感受性はウイルス株によっても、また、ウイルス産生細胞によっても異なることが知られている。そこで、その機構を解析した。その結果、Env蛋白の質(株)および量が、Nef依存性に変化を与えていることがわかった。また、標的細胞のCD4の量が少ないと、Nef依存性が増強することを見出した。以上の結果は、ウイルス感染が効率よくは起きない、in vivoでNefが重要な働きをするという観察を支持する結果である。

### A. 研究目的

HIV粒子の感染効率はさまざまな細胞内情報伝達因子により制御されており、ウイルスを産生する細胞の状態が、産生されたウイルスの標的細胞に対する感染効率を大きく左右する。特にHIVのアクセサリー蛋白は、細胞内宿主因子と作用することによりウイルス感染効率を上昇させている。本研究では、HIVの病原性を規定するNef遺伝子の機能を探るために、どのようなウイルス側および宿主側因子がNefの機能に関連するかを解析した。

### B. 研究方法

**感染性ウイルスの作成**：293T細胞にNL43株、SF2株、それらのキメラおよび、それぞれのNef欠損体のDNAをトランスフェクトして、組替えウイルスを得る。得られた上清中のウイルスはp24gagに対するELISAでウイルス量を定量する。

**MAGIアッセイ**：同量のウイルスをHeLa-MAGI細胞およびMAGIC5細胞、およびMAGIC5にCD4を強発現させた細胞に感染させ、48時間後に、X-Galで染色することにより、感染細胞を同定し、感染効率を解析する。

**Envの定量**：上清中のウイルスを超遠心により精製し、その中のEnvおよびGag量をELISAにより定量した。同様に、上清中の遊離のEnvも定量した。

**Entryアッセイ**：MAGIC5細胞に等量のCATをコードする組替えHIVウイルスを感染させ、2時間後に、トリプシンで処理して、付着した細胞をのぞく。可溶化したのち、MAGIC5細胞内に入ったウイルスゲノムをCAT遺伝子を標的として、PCRにより、ABI7700を用いて定量す

る。

**融合アッセイ**：293T細胞にEnv発現ベクターおよびTat発現ベクターをNef存在下および非存在下にトランスフェクトする。24時間後に、MAGIC5細胞を加え、さらに48時間、培養する。細胞を固定したのちX-Galで染色し、融合活性を測定する。

### C. 研究結果

- ① NL43およびSF2キメラによる検討：昨年度の研究で、SF2のEnv領域を含む部位がSF2のNef依存性を高めているという結果が得られた。そこで、SF2のEnv領域のみをNL株にいれた組替えHIVを作成し、そのウイルス上でNefを欠損させ影響を調べた。すると、SF2のEnvをNL株にいれると、このキメラウイルスはNefを欠損すると、感染性が20分の1以下に下がることを見出し、Nef依存性がEnv領域により規定されていることを明らかにした。
- ② この結果は、Envの質的な違いがNef依存性を決めることを示したものである。そこで、今度はEnvの量がNef依存性に及ぼす影響を解析した。Envの量を減少させると、NL43株においてもSF2株同様に、Nef依存性が強くなることを見出した(図)。
- ③ これらの結果は、細胞融合の効率がNef依存性を決めているのではないかと考えさえる。そこで、MAGIC5細胞のうち、CD4発現量の少ない細胞を選び、この細胞を用いて感染実験を行ったところ、Nef依存性がNL株においても強く認められた。このMAGIC5細胞にCD4をさらに発現させると、Nef依存性が減少することがわかった。
- ④ これらの機構は、Nefが細胞融合活性を制御してい

るのではないかと思わせる。そこで、293T細胞をもちいて、細胞融合アッセーを行ったが、Nefの影響は明らかではなかった。

- ⑤ 次に、ウイルスのエントリー活性を比較した。CD4のすくないMAGIC5細胞およびCD4の多いMAGIC5E細胞とを用いて行ったが、Nefの影響は認められなかった。

#### D. 考察

本研究においては、HIVの病原性遺伝子Nefのウイルス感染増強作用に影響を及ぼすウイルス側因子および宿主側因子について検討した。その結果ウイルスに発現するEnvの量および細胞表面に発現するCD4の量が、Nef依存性を制御することが明らかになった。

ここで明らかにしたNef依存性がCD4あるいはEnvに規定される機構はこれからの研究テーマである。もっとも考えやすいのは、Nefが標的細胞への侵入を増強する、というモデルであるが、これは、今回の研究により否定された。もうひとつには、1個の細胞に多くのnon-infectious virusが感染することがNef依存性を低下させる、という可能性も考えられる。しかし、われわれが、ウイルスを十分希釈しても、Nef依存性に差は認められなかったため、これらはウイルスそのものが持つ性質である可能性が高い。現在考えているモデルは、Env-CD4複合体からのウイルスコア蛋白の細胞内への放出およびそれに伴う逆転写の開始をNefが促進するというものである。EnvあるいはCD4が過剰に存在する条件では、Nefは十分にこれらの活性を押さえることはできないが、EnvおよびCD4が過剰にあるときには、ウイルスの侵入も亢進して、このNef依存性のウイルス粒子放出が見えないのかもしれない。

さらに、興味深いことは、本実験のデータはこれまでの試験管内の実験がNefの影響を過少評価していた可能性が示唆することである。実験に用いているT細胞やMAGI細胞のCD4が、個体レベルでの感染細胞より多いと思われる。われわれが示したように、CD4の発現量を減少されると、Nef依存性が増強するので、個体レベルでのたとえば樹状細胞やマクロファージにHIVが感染するときには、Nef依存性はより強くなっていると思われる。また、Envに関しても同様のことが言える。患者より分離してきた新鮮なHIV(初代分離株)は、継代をへた実験室株と比較すると、感染においてCD4要求性が強いと言われている。このようなEnvを持つウイルスは、おそらくNef依存性が高いことが容易に想像され、実際に患者血中で増えているHIVにおいては感染におけるNef依存性は実験室株よりかなり高いと思われる。

#### E. 結論

HIVの病原性遺伝子Nefの活性を制御する細胞側およびウイルス側因子を明らかにした。

#### F. 研究発表

[論文発表]

1. Mochizuki, N., N. Otsuka, K. Matsuo, T. Shiino, A. Kojima, T. Kurata, K. Sakai, N. Yamamoto, S. Isomura, T. N. Dhole, Y. Takebe, M. Matsuda, and M. Tatsumi. 1999. An infectious DNA clone of HIV-1 subtype C. AIDS Res. Hum. Retroviruses 15:1321-1324.
2. Tokunaga, K., K. Ikuta, A. Adachi, M. Matsuda, T. Kurata, and A. Kojima. 1999. The cellular kinase binding motifs (PxxP and RR) in human immunodeficiency virus type 1 Nef protein are dispensable for producer cell-dependent enhancement of viral entry. Virol. 257:285-289.

[学会発表]

望月直樹、松田道行、巽正志:HIV-1サブタイプCの感染性分子クローンpIndie-C1 第47回日本ウイルス学会総会 横浜 平成11年11月

飛梅実、望月直樹、大塚尚美、巽正志、松田道行:HIV-1感染におけるNef要求性についての解析第47回日本ウイルス学会学術集会 横浜 平成11年

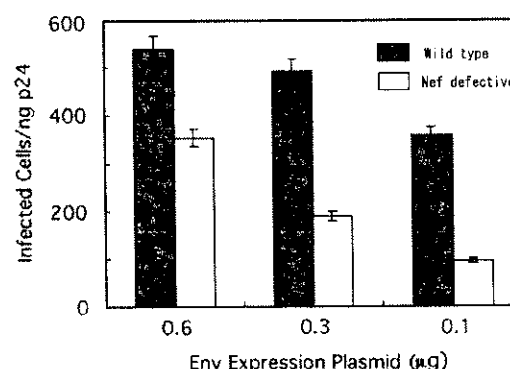


図 Envの量がNef依存性を決める。293T細胞にNefありおよびNefなしのHIV、様々な量のEnvベクターと強発現させ、得られたウイルスの感染価を調べた。



## 6. HIV プロウイルスからの転写制御：RelA-associated inhibitor (RAI)によるHIV-1複製の抑制とその分子機構

分担研究者 岡本 尚 (名古屋市立大学医学部分子遺伝)

共同研究者 楊 建平、三田貴臣、朝光かおり、手塚俊文

**研究要旨** 酵母 two-hybrid screening法を用いて宿主因子NF- $\kappa$ Bを抑制する新たな分子RAIを同定した。RAIは核内に局在し、シグナルによって核に移行したNF- $\kappa$ Bと結合し、その活性を抑制した。NF- $\kappa$ Bは宿主因子としてHIV転写に主要な役割を持ち、RAIはHIVの転写を効率よく抑えることから、新たなHIV感染症阻止戦略開発への応用が期待される。

### A. 研究目的

細胞内に潜伏するプロウイルスからの転写の段階での制御はHIVの増殖の律速段階速度であると考えられる。プロウイルスからの遺伝子発現は、主に宿主細胞の転写活性化因子NF- $\kappa$ BとウイルスのコードするTatによって段階的に制御されている。潜伏感染細胞内ではウイルスの遺伝子発現は抑えられており、その初期の遺伝子発現は宿主因子によって誘導されることが考えられることから、NF- $\kappa$ BによるHIVプロウイルス転写制御機構はHIV感染者からのウイルス増殖の誘導に主要な役割を演じていると考えられる。多くの蛋白分子は蛋白分子間の相互作用によって制御されている。我々はNF- $\kappa$ Bの活性制御に関わる未知の宿主因子を分子間相互作用を用いたtwo-hybrid法によって同定し遺伝子クローニングを試みた。

### B. 研究方法

NF- $\kappa$ Bのp65(RelA)サブユニットの中央部分をベイトに用いてヒト胎盤および脳由来のcDNA library (Matchmaker, Clontech社)で酵母two-hybrid screeningを実施した。得られたクローンのプラスミッドを精製し、p65との相互作用を酵母細胞内で確認した後、遺伝子配列を決定した。未知の遺伝子の場合には、組み換え蛋白を作成し*in vitro* pull-down assayを行って相互作用を確認した。また、生細胞内(*in vivo*)での相互作用はFLAGエピトープを標識した蛋白を細胞内で発現させ、FLAG抗体で免疫沈降後ウエスタンブロットでp65蛋白が共に複合体の一部として沈

殿するかを確認した。なお、細胞内局在はGFPとの融合蛋白発現ベクターを作成し細胞内に導入して調べた。NF- $\kappa$ B依存性遺伝子発現に対する効果は、 $\kappa$ Bモチーフを持つルシフェラーゼ発現ベクターやp65サブユニット発現ベクターとともに細胞内に導入して定量的に検定した。また、NF- $\kappa$ B(p65)のDNA結合に及ぼす効果については遺伝子導入細胞より核抽出液を調整しEMSA法によって検定した。

### C. 研究結果

p65サブユニットの中央部分をベイトとしてこれと結合する蛋白の遺伝子クローニングを酵母two-hybrid screeningを用いて実施した。約3000000個のcDNAクローンから新たな遺伝子RAI (RelA-associated inhibitor)を同定した(遺伝子特許申請中)。Table 1に酵母でのRAIとp65との結合を示した。また、Fig.1にはRAIとp65が直接結合することを示す*in vitro* pull-down assayの結果を提示した。Fig.2Aに示したように、RAIはアンキリンリピートとSH3ドメイン構造を持ちI $\kappa$ Bと似た蛋白分子構成を示していたが、アミノ酸配列レベルでの相同性はなかった。むしろ、53BP2とよく似ていたが(Fig.2B)、後述するように機能的な共通点は見出されなかった。FLAGエピトープを付加したRAI蛋白は遺伝子導入によりHeLa細胞内で充分量の蛋白を発現したので(Fig. 2C)、p65との相互作用を次に検定した。Fig.3に示したように、p65発現プラスミッドとともに細胞内で発現させたRAIはI $\kappa$ B $\alpha$ ほどではないが明らかにp65と結合した。

RAI の細胞局在を調べるためにGFPとRAIとの融合蛋白を細胞内で発現させた (Fig. 4)。N末領域は細胞内全域にわたって局在したが、C末領域は明らかな既知の核局在シグナルを持たないにも関わらず核に優位に局在し、全長のRAIは核のみに局在が認められた。Fig. 4G-Lに示すように、NF- $\kappa$ B活性化の生理的なシグナルであるTNFによってNF- $\kappa$ B (p65) の核への移行が認められたが、RAI は刺激前より核に存在し、刺激後核に移行してきたNF- $\kappa$ Bと同様の局在パターンを示した。この結果をFig. 3の実験結果と併せると、RAI は予め核に局在し、活性化されて核に移行してくるNF- $\kappa$ Bと結合しその作用を抑えているように見える。

Fig. 5ではNF- $\kappa$ B依存性の遺伝子発現に対するRAIの効果をルシフェラーゼアッセイで調べた結果を示している。RAI はNF- $\kappa$ B (p65) による遺伝子発現を量依存性に抑制し、mutant  $\kappa$ B をプロモーター領域に持つコントロールでは遺伝子発現量に変化は見られなかった。Fig. 5CはTNFによるNF- $\kappa$ B依存性遺伝子発現に対する効果を見た結果であるが、同様に抑制効果が見られた。しかしながら、I $\kappa$ B $\alpha$ による効果に比べてその抑制効果は弱かった。Fig. 5Dの結果から、この抑制効果はRAI 分子上のC末端領域によって引き起こされておりN末端側の領域では抑制が起らないことが示唆された。

#### D. 考察および結論

RAI はp65の中央部分と分子間相互作用をする性質で新たに分離された抑制因子である。その性質はI $\kappa$ B $\alpha$ と類似するが、今回行った種々の実験よりその作用は独特であることが明らかになった。RAI は細胞内では核内に予め存在し、シグナルによって活性化されたNF- $\kappa$ Bが核に移行した際にこれと結合し、その作用を抑制するように見える。このような性質から、RAI はI $\kappa$ B $\alpha$ とは異なり、活性化されたNF- $\kappa$ Bの核での作用を抑えるfail-safe的な作用かもしれないことが示唆された。従って、HIV潜伏感染細胞においても細胞外からのシグナルによって活性化されたNF- $\kappa$ Bおよびプロウイルスからのウイルス増殖をそ

の水際で抑える重要な働きをもつのではないかと示唆される。従って、RAI のectopic な発現を増強もしくはRAI 自体の活性化制御がもしあるのならばその機構を増強することが、HIV増殖を押さえ込む治療法の開発へとつながると考えられる。いずれにしても、NF- $\kappa$ Bの制御機構については今回新たな因子が同定されたように、今後も研究の余地があると考えられた。

#### E. 研究発表 (英文原著論文)

- 1) Saliou, C., Kitazawa, M., Mclaughlin, L., Yang, J.-P., Lodge, J.K., Iwasaki, K., Cillard, J., Okamoto, T. and Packer, L.:Antioxidants modulate acute solar ultraviolet radiation-induced NF-kappa-B activation in a human keratinocyte cell line. *Free Radic. Biol. Med.*26:174-183,1999.
- 2) Asamitsu, K., Sakurada, S., Mashiba, K., Nakagawa, K., Torikai, K., Onozaki, K. and Okamoto, T.:Alteration of the cellular response to interleukin 1 $\beta$  by SV40 large T antigen in rheumatoid synovial fibroblasts.*Arch. Virol.*144:317-327,1999.
- 3) Traber, E.K., Okamoto, H., Kurono, C., Baba, M., Saliou, C., Soji, T., Packer, L. and Okamoto, T.:Anti-rheumatic compound aurothioglucose inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced HIV-1 replication in latently infected OM10.1 and Ach2 cells. *Int. Immunol.*11:143-150,1999.
- 4) Yoshida, S., Kato, T., Sakurada, S., Kurono, C., Yang, J.-P., Matsui, N., Soji, T. and Okamoto, T.:Inhibition of IL-6 and IL-8 induction from the cultured rheumatoid synovial fibroblasts by treatment with aurothioglucose.*Int. Immunol.*11:151-158,1999.
- 5) Okamoto, M., Okamoto, T. and Baba, M.:Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by combination of transcription inhibitor K-12 and other antiretroviral agents in acutely and chronically infected cells.*Antimicrob. Agents. Chemother.* 43:492-497,1999.
- 6) Yang, J.-P., Hori, M.,Sanda,T. and Okamoto,T.: Identification of a novel inhibitor of nuclear Factor- $\kappa$ B,RelA-associated inhibitor. *J.Biol.Chem.*274:15662-15670,1999.
- 7) Yang, J.-P., Hori, M.,Takahashi,N., Kawaba, T., Kato, H. and Okamoto, T.: NF- $\kappa$ B subunit p65 binds to 53BP2 and inhibits cell death induced by 53BP2. *Oncogene.*18:5177-5186,1999.
- 8) Takahashi, N., Takada, N., Hashimoto, T. and Okamoto, T.:Genetic heterogeneity of the immunogenic viral capsid protein region of human parvovirus B19 isolates obtained from a single outbreak in a paediatric ward.*FEBS Lett* 450:289-293,1999.
- 9) Goto, D., Izumi, H., Ono, M., Okamoto, T., Kohno, K., and Kuwano, M.:Tubular morphogenesis by genotoxic therapeutic agents that induce NF- $\kappa$ B activation in human vascular endothelial cells. *Angiogenesis* 2:345-356,1999.
- 10) Yoshida, S., Katho, T., Tetsuka, T., Uni, K., Matsui, N. and Okamoto,T.:Involvement of Thioredoxin in

rheumatoid Arthritis: Its co-stimulatory roles in the TNF- $\alpha$ -induced production of IL-6 and IL-8 from the cultured synovial fibroblasts. *J. Immunol.* 163: 351-358.1999.

- 11) Maurice, M. M., Nakamura, H., Okamoto, T., Yoshida, S., Kullmann, F., Lechner, S., van der Voort, E. A. M., Leow, A., Versendaal, J., Muller-Landner, U., Yodoi, J., Tak, P. P., Breedveld, F.C., and Verweij, C. L. : Expression of The thioredoxin-thioredox reductase system in the inflamed joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* (in press)
- 12) Asamitsu, K., Morishima, T., Tsuchie, H., Kurimura, T. and Okamoto, T.: Conservation of the central proline-rich (PxxP) motifs of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein during the disease progression in two hemophiliac patients. *FEBS Lett.* 459:399-404.1999.
- 13) Suganuma, M., Kawabe, T., Hori, H., Funabiki, T. and Okamoto, T.:Sensitization of cancer cell to DNA damage-induced cell death by specific cell cycle G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res.* 59:5887-5891.1999.
- 14) Sakaguchi, T., Nakamura, S., Suzuki, S., Oda, T., Ichiyama, A., Baba, S. and Okamoto, T.: Participation of platelet-activating factor in the lipopolysaccharide - induced liver injury in partially hepatectomized rats. *Hepatology* . 30:959-967.1999.
- 15) Suzuki, M., Tetsuka, T., Yoshida, S., Watanabe, N., Kobayashi, M., Matsui, N. and Okamoto, Y.: The role of p38 mitogen-activated protein kinase in IL-6 and IL-8 production from the TNF- $\alpha$  or IL-1 $\beta$  stimulated rheumatoid synovial fibroblasts. *FEBS Lett.* 465:23-27.2000
- 16) Mori, T., Okamoto, H., Takahashi, N., Ueda, R., and Okamoto, T.: Aberrant overexpressin of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines . *FEBS Lett.* 465:124-128.2000.
- 17) Tetsuka, T., Uranishi, H., Imai, H., Ono, T., Sonta, S., Takahashi, N., Asamitsu, K., Okamoto, T.: Inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B-mediated transcription by association with the amino-terminal enhancer of split (AES), a Groucho-related protein lacking WD40 repeats. *J. Biol. Chem.* 275: 4383-4390, 2000.
- 18) Kameoka, M., Ota, K., Tetsuka, T., Tanaka, Y., Itaya, A., Okamoto, T. and Yoshihara, K.: Evidence for Regulation of NF- $\kappa$ B by Poly (ADP-ribose) Polymerase. *Biochem. J.* (1999)
- 19) Kanazawa, S., Okamoto, T., Matija Peterlin, B.: Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity*, 12:61-70, 2000

TABLE I  
Specificity testing of RAI interactions with multiple genes in the yeast two-hybrid system

Yeast Y190 cells were cotransformed with expression vectors encoding various GAL4 DNA-binding domain (BD) and GAL4 transcription activation domain (AD) fusion proteins. Colonies of equal size were replated in the presence of 25 mM 3-AT and allowed to grow for 3 days at 30 °C.  $\beta$ -Galactosidase activity was assayed by using a standard filter assay. Growth on 3-AT plates and  $\beta$ -galactosidase activity are scored as a range from no growth on 3-AT plates and no  $\beta$ -galactosidase activity (-) to activity generated by the strong positive control (++++).

Yeast two-hybrid (BD/AD)	Growth on 3-AT plate	$\beta$ -Galactosidase assay
p65(176-405) /vector	-	-
p65(176-405) /p65(176-405)	+++	+++
p65(176-405) /RAI	+++	+++
p53 /vector	-	-
p53 /RAI	-	-
p53 /53BP2	+	+
p53 /T-antigen	++++	++++

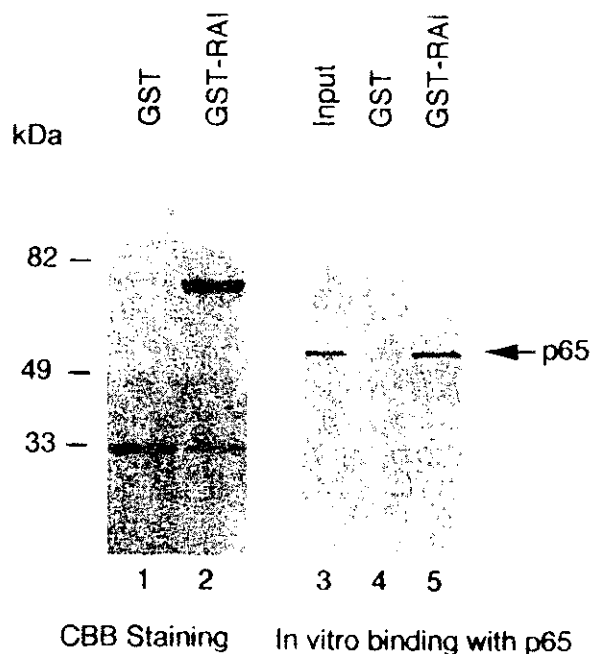


FIG. 1. **Binding of RAI to p65 *in vitro*.** GST-RAI fusion proteins were produced in *E. coli* and purified by incubation with glutathione-Sepharose beads. The beads were washed and the bound proteins were resolved on SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue (lanes 1 and 2). [<sup>35</sup>S]Methionine-labeled p65 translated *in vitro* was incubated with glutathione-Sepharose beads loaded with GST or GST-RAI. After washing the beads, the eluted proteins were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. 1/10 of the labeled p65 translated *in vitro* was also run (lane 3). The p65 band is indicated by an arrow.