

**A**

```

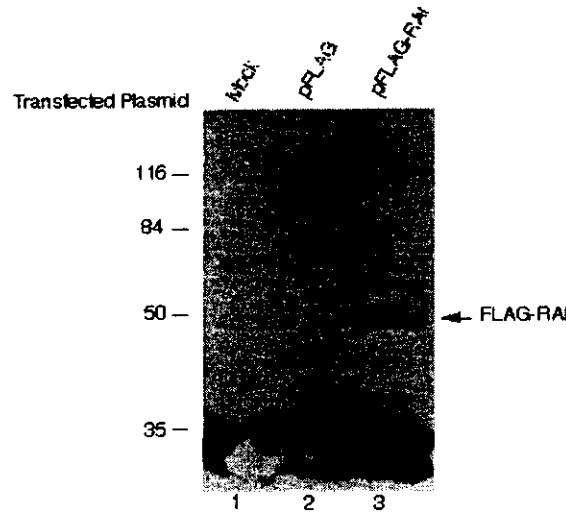
MNKDPVAPR LSPTRLQPAL PPEAQSVEPEL EEARVLAETI PRPLKRRGSM EQAPAYALPP 60
TKKKYQQII SRLFRNGEP GPGRSQSCP PSLRDLRPGQ CPLLLPHQLP FHRPAPSQSS 120
PPEQPQSMEM RSVLRKAGSP RKARRARLNP LVLLLDALIT GELEYVQQAV KEMNDPQQPN 180
EGITALHWA ICGANYSIVD FLITAGANVM SPDSHGWTPL HCAASCNDTV ICMALVQNGA 240
ank1
ank2
ank3
AIFATLSDG ATAFKCDPY REGYADCATY LADWEQSMGL NMSGAYALM DYSAEFGDEL 300
ank4
SFREGESVTV LRRDGPEETD WMAALHGOEG YVPRMYFGL FPRVKPQSK V 351
sh3

```

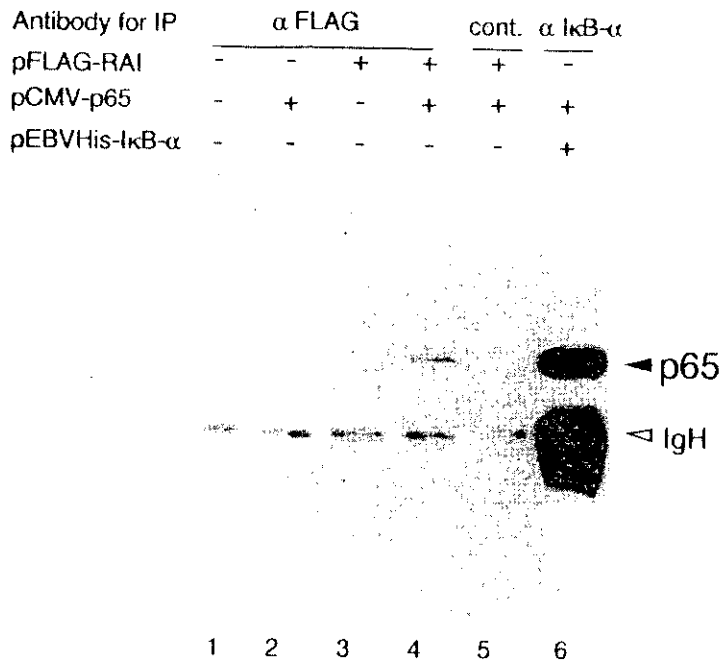
**B**

hRAI ank1	145	--RARLNPLVLLD AALITGELEVQAVKENND	174
		*...***...*	
h53BP2 ank1	796	GMRVKFNPLALLDSSLEGEFDLVDRIIYEVD	828
hRAI ank2	176	PSQPNEEGITALHNAICGANYSIVDFLITAGAN	208
		**...*****...*	
h53BP2 ank2	829	PSLPNDEGITALHNAVCAGHTEIVKFLVQEGVN	861
hRAI ank3	209	VNSPDSHGWTPLHCAASCNDIVICMALVQHGAII	241
		*...*****...*	
h53BP2 ank3	862	VNAADSDGWTPLHCAASCNNVQVCKFLVESGAIV	895
hRAI ank4	243	FATLSDGATAFEKCDPYREGYADCATYLADVE	275
		**...***...*	
h53BP2 ank4	896	FANTYSDMOTAADKCEE MEEGYDQCSQFLYGVQ	928
		▲▲▲▲▲	
hRAI sh3	287	YALNDYSAEFGDEL SFREGESVTV LRRDGPEETD WMAALHGOEGYVPRMYF	338
		*****...*****...*	
h53BP2 sh3	940	YALNDYE PNDDELPMKEGDCMTI IHRREDEDE IENHWARLNDKEGYVPRNLL	991
		▲▲▲▲▲	

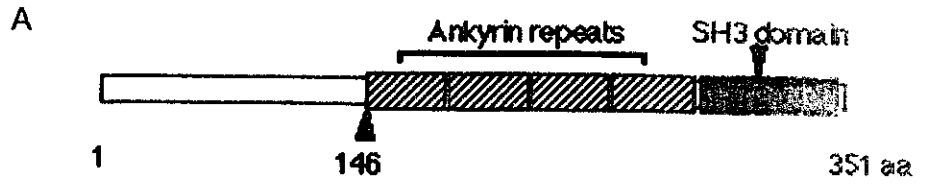
**C**



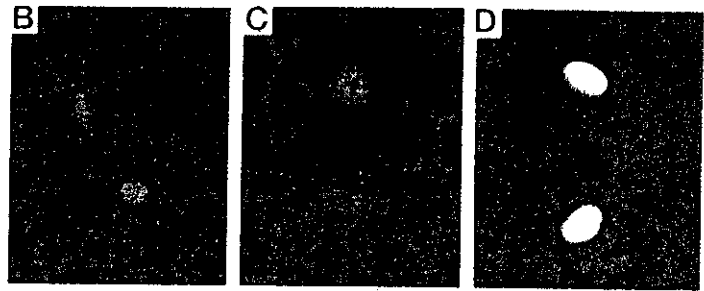
**FIG. 2. RAI protein.** *A*, amino acid sequence of RAI. Ankyrin repeats (*ank*) are underlined and the SH3 domain (*sh3*) is double underlined. The start sites of the clones isolated in the yeast two-hybrid screen are indicated by a *open triangle* (one clone encompassing amino acids 57–351) and a *filled triangle* (three identical clones encompassing amino acids 78–351). The nucleotide sequences encoding human RAI are available as AF078036 and AF078037 in GenBank. *B*, homology between RAI and 53BP2. Amino acid sequence alignments of C-terminal regions of human RAI and human 53BP2. \* indicates identical residues. · shows conserved amino acid residues. The putative amino acid residues of human 53BP2 that are known to interact with p53 are indicated by the *filled triangle*. *C*, expression of RAI protein. HeLa cells were transfected with the construct expressing FLAG-tagged RAI, empty vector, or mock transfected. Protein extracts were analyzed by Western blotting with anti-FLAG tag antibody. Sizes are indicated in kilodaltons.



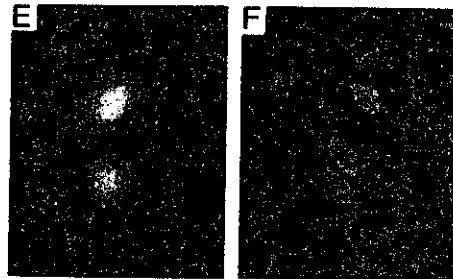
**FIG. 3. Association of RAI with p65 in 293 cells.** Whole cell lysates were prepared from 293 cells 24 h after transfection with the indicated plasmids and were precipitated with the following antisera: *lanes 1-4*, anti-FLAG; *lane 5*, anti-IgG; *lane 6*, anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ . Immune complexes were collected and subjected to SDS-PAGE followed by Western blotting with anti-p65 antibody. The position of the p65 proteins (*filled arrow*) and Ig heavy chain proteins (*open arrow*) are indicated.



pEGFP-RAI pEGFP-RAI (1-146) pEGFP-RAI (132-351)

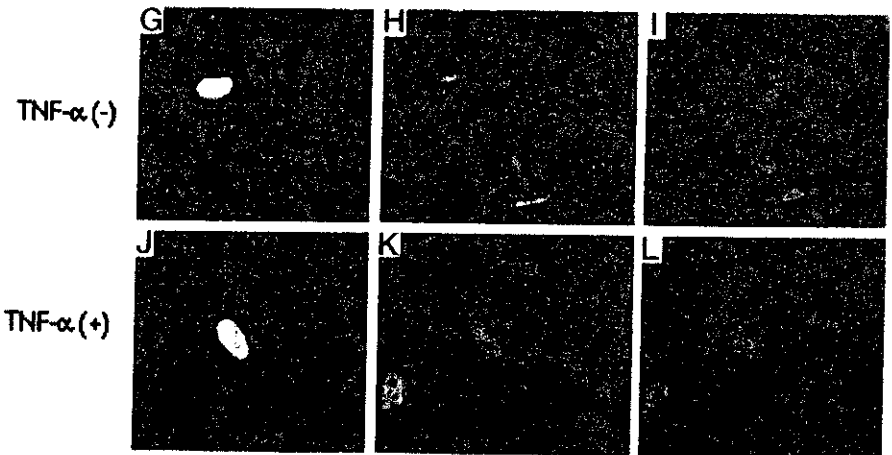


pEGFP pEGFP-p65 (176-405)

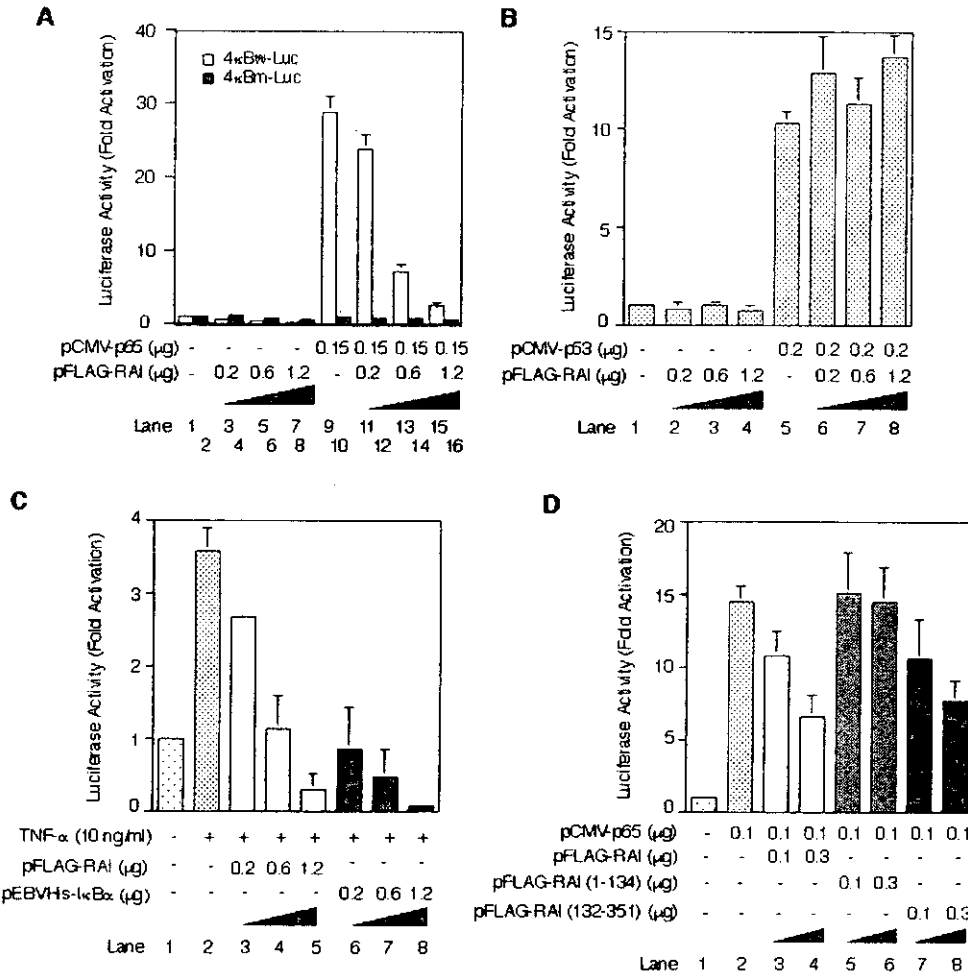


**FIG. 4. Subcellular distribution of RAI.** *A*, schematic diagram of RAI protein. *B-F*, subcellular localization of various GFP-RAI fusion proteins, GFP and GFP-p65 (176-405) in the transiently transfected HeLa cells. Various GFP fusion proteins were visualized by fluorescence microscopy. *G-L*, colocalization of RAI with p65 induced with TNF- $\alpha$ . HeLa cells were transfected with GFP-RAI expressing plasmid and after 24 h cells were left untreated or treated with TNF- $\alpha$  for 0 min. Immunofluorescence microscopic examinations were carried out with anti-p65 antibody. Cell nuclei were stained with Hoechst-33342. The cells in *G*, *H*, and *I*, or those in *J*, *K*, and *L* were the same cells, respectively.

pEGFP-RAI  $\alpha$ -p65 Hoechst-33342



*RelA-associated Inhibitor of Transcription*



**Fig. 5. Inhibition of NF-κB-dependent gene expression by RAI.** *A*, HeLa cells were transfected with either 4κBw-Luc (containing wild type NF-κB binding sites) or 4κBm-Luc (containing mutated NF-κB binding sites) together with pCMV-p65 and various amounts of pFLAG-RAI plasmids. *B*, Saos-2 cells, a p53-null cell line, were transfected with p53-dependent luciferase reporter (PG13-Luc) together with pCMV-p53wt and pFLAG-RAI plasmids. Cells were lysed and the luciferase activities were measured 24 h after transfection. *C*, Jurkat cells were transfected with 4κBw-Luc together with increasing amounts of pFLAG-RAI plasmid. After 24 h of transfection, cells were treated with 5 ng/ml TNF-α and harvested after an additional incubation for 24 h. *D*, responsible region of RAI in inhibiting NF-κB-dependent gene expression. 293 cells were transfected with 4κBw-Luc together with pCMV-p65 and various RAI expression plasmids. Results of RAI inhibition were observed in all cell lines examined. The representative data are demonstrated. The luciferase activity was normalized by *Renilla* luciferase activity that was co-transfected as an internal control. The data are presented as the fold increase in luciferase activities (mean ± S.D.) relative to control transfection of three independent experiments.

## 7. Rev と関連因子

分担研究者 志田壽利（京都大学ウイルス研究所）

研究要旨 HIV の Rev と HTLV-I の Rex は mRNA 上で多量体化することが、mRNA を輸送するために必要である。我々は Rev/Rex の主要コファクターである hCRM1 がこの多量体化に必須であることを報告してきた。今年度はラット rcrm1 cDNA をクローニングして hcrm1 と比較することによって以下の結果を得た。1. CRM1 のコファクター活性は Rev/Rex を多量体化させる能力に大きく依存する。2. Rev/Rex との結合と多量体化促進能は CRM1 内の別のドメインが担う。

### A. 研究目的

HIV はスプライシングを制御することにより、数多くの遺伝子を小さなゲノムにコードしている。スプライシングを制御する因子として Rev を自身がコードしている。Rev はイントロンを含む gag や env mRNA の細胞質への発現に必要である。また、HTLV-I は同様の機能を持つ Rex をコードしている。Rev/Rex は細胞質で合成後核内に移入し、ウイルス RNA と結合して核外に輸送する。Rev と Rex はその機能を果たすために核内移入シグナル(NLS)と核外移行シグナル(NES)を有している。Rev/Rex が RNA を搬出するためには、Rev/Rex の単一分子では不十分であり、RNA 上で多量体化することが必要である。Rev/Rex の NES に結合する主要コファクターとして hCRM1 が同定された。我々は hCRM1 が Rev/Rex を核外に運ぶだけでなく、Rev/Rex の多量体化に必要であることを報告してきた。

ラットは以前より HTLV-1 の感染モデル動物として使用されてきた。しかし、体内でのウイルス増殖が悪く不完全なモデルであった。最近、HTLV-1 の感染したラット細胞内では、tax/rex の mRNA は十分合成されているにもかかわらず、gag と env の mRNA 量が非常に少ないことが報告された。このことは Rex の働きが悪いことを示唆している。

そこで本年度はラット rcrm1 cDNA をクローニングして、Rex と Rev のコファクターとしての活性を hCRM1 と比較検討した。

### B. 研究方法

プラズミド：Rev, Rex, hCRM1 などの発現に pSR $\alpha$ 296 を用いた。

レポーター：Rev 活性測定のための pDM128(HIV ゲノムの tat-env 領域のイントロンに CAT 遺伝子を挿入したもの)、HTLV-I の Rex 活性測定用 pDM128RXRE (pDM128 に HTLV-I の LTR を挿入したもの) を用いた。

mRNA の発現の測定：レポーターと Rev/Rex 発現プラズミドを HeLa 細胞にコトランスフェクションした。上記レポーターからのイントロン部分を持つ mRNA のみが CAT をコードしている。従って、CAT 蛋白を ELISA 法によって定量することにより mRNA 量の定量に換えた。トランスフェクション効率を補正するために、pCDM $\beta$ -gal をいつもコトランスフェクションした。

Two hybrid assay による蛋白質間相互作用の測定：Gal4 の DNA 結合領域と目的蛋白の融合蛋白を発現するプラズミドと、他方 VP16 の活性化領域と目的蛋白質の融合蛋白発現プラズミドを構築した。これらのプラズミドとレポーターである

pGB5CATをHeLa細胞にコトランスフェクトして、CATの生産量を測定することにより蛋白質間相互作用の指標とした。

コファクター活性の測定：優性阻害変異体であるTAgRexM64は細胞のコファクターを奪うことによってRev/Rexの活性を阻害する。そこで、まず、TAgRexM64によってRev/Rexの活性を抑えてから、CRM1を過剰発現させてやることによって活性が回復するかどうかでコファクター活性を測定した。

## C. 研究結果

### 1. ラットrCRM1の性質

ラット細胞中でのRevとRexの活性を測定したところ、Revの活性はHeLa細胞の場合と同様であったが、Rexの活性はほとんど検出できなかった。このラット細胞中でのRexの機能不全の原因を追求するために、ラットのrcrm1 cDNAをRT-PCR法によってクローニングした。決定した塩基配列から推定すると、rCRM1はhCRM1とアミノ酸レベルで97%一致していた。TAgRexM64による活性の阻害を、過剰発現させることにより解除できるかどうかを指標にして、hCRM1またはrCRM1のRevとRexに対するコファクターとしての活性を検討した。その結果、rCRM1はRevのコファクターとしては機能するがRexに対しては働かないことが分かった。次に、ラット細胞にhCRM1をトランスフェクトしてやるとRexが働くようになった。この結果より、ラット細胞でRexが効率よく働けない原因がrCRM1にあることが分かった。

次に、rCRM1がコファクターとして働けない機構を調べた。まず、two-hybrid assayでRexとの結合能を調べたところ、hCRM1の約半分の効率であった。次に、Rexの多量体化促進能を調べたところほとんどないことが分かった。他方、Revに対しては、結合力はhCRM1の約5%程しかないにもかかわらず、多量体化促進能はhCRM1と同程度有し

ていた。これらの結果は、CRM1のコファクター活性はRev/Rexを多量体化させる能力に大きく依存していることを示唆している。

### 2. hCRM1とrCRM1のキメラ

ここで多量体形成過程に関して2つの可能性が考えられる。まず、CRM1がNESを介して結合すると、Rex/Revのコンフォメーションを変化させ、引き続いて多量体化が起こる可能性である。この仮説に従うと、rCRM1とRexの結合能はhCRM1の約半分であるために、Rexの多量体化を促すには不十分であったことが考えられる。他方、Revは、昨年度報告したように、多量体化のためのhCRM1の要求性がRexより少ない。そのために、小さな結合力でRevの多量体化を促したと考えられる。2つ目の可能性はCRM1のRex/Revとの結合能と、CRM1のRex/Rev多量体化促進能は別の機能であり、hCRM1は両方を兼ね備えているが、rCRM1は後者を欠くというものである。この2つの仮説を検証するために、hCRM1とrCRM1キメラ分子を作製して性質を調べることにした(図1)。hCRM1とrCRM1は22個の異なるアミノ酸を有している。そのうちの11個はN末1-679アミノ酸領域内に存在する。そこで、679番目のアミノ酸を境にN末端がhCRM1でC末端側がrCRM1の配列を持つhrCRM1と逆のrhCRM1を作製した。それらの性質を調べたところ、hrCRM1はRexに対してrhCRM1よりも弱い結合能を持つにもかかわらず、hCRM1とほぼ同等の多量体化促進能を持ち、従って、Rexの活性を支持した。rhCRM1は逆に、hrCRM1よりも強い結合能を持つにもかかわらず、Rexの多量体化を支持せずに、コファクター能を持たなかった。この結果は、Rexの多量体化を支持する能力は効率的な結合とは切り離される機能であることを示している。Revに対しての結合能はhrCRM1、rhCRM1共に弱く、rCRM1と同程度で、hCRM1の5%程度しかなかった。しかし、Revの多量体化促進能はhCRM1と同程度であり、Revの

コファクターとしては hCRM1 と同様に機能した。このことは CRM1 がコファクターとして働くためには、結合能の強さではなく Rev の多量体化支持能がより大事であることを示している。また、効率的に Rev/Rex に結合するためには CRM1 の広範囲にわたる領域から形成される構造が大切であることを示唆している。

#### D. 考察

昨年度我々は hCRM1 が単に Rev と Rex を核外に輸送するだけでなく、多量体化にも関与していることを見出した。特に、Rex において hCRM1 の要求性が高かった。

今年度、我々はラットの rCRM1 を hCRM1 と比較することにより、CRM1 と Rev/Rex 間の相互作用に関して新しい知見を得た。Rev/Rex は、まず NES 領域で CRM1 と結合する。他方、CRM1 側の結合部位は *in vitro* の実験から aa number 560-810 であると見なされている。我々は aa679 を境にして hCRM1 と rCRM1 間のキメラを作製したところ、どのキメラも弱い結合能しか持っていなかった。特に Rev に対しては hCRM1 の 5%程度の結合力しかなかった。aa 560-810 領域は種間で非常によく保存されており、793 番目がセリン(hCRM1)とプロリン(rCRM1)で異なるだけである。従って、効率よく Rev/Rex と結合するためには aa 560-810 以外の CRM1 の広範囲にわたる領域間の相互作用と構造が必要であると考えられる。

効率的な結合力と多量体化支持能はリンクしていなかった。特に Rex においては低い結合能を持つ hrCRM1 が多量体化支持能を持ち、より高い結合能を持つ rhCRM1 がほとんど多量体化支持能を持たなかった。この結果は N 末端が human CRM1 型であることが多量体化の支持に必要であることを示していると共に、多量体化支持能は Rex との結合能とは独立した機能であることを示唆している。この考察はさらに、CRM1 が Rex のコファク

ターとして働くためには単に NES に結合するだけでは不十分であり、より高次の相互作用を通じて Rex を多量体化させることが必要であることを示している。他方、Rev は多量体化に CRM1 を要求するものの、依存度は低く NES との弱い結合だけで十分であることが考えられる。

#### E. 結論

1. CRM1 のコファクター活性は Rev/Rex を多量体化させる能力に大きく依存する。2. Rev/Rex との結合と多量体化促進能は CRM1 内の別のドメインが担う。

#### F. 研究発表

[論文発表]

1. Ibuki, K. Ido, E. Funahashi, S. Miura, T. Hayami, M. and Shida, H. (1999): Protective effects to simian immunodeficiency virus agm (SIVagm) infection in cynomolgus monkeys immunized with a recombinant vaccinia virus expressing the SIVagm envelope gene. *Vaccine* 18:511-516.
2. Suzuki, Y. Koyanagi, Y. Tanaka, Y. Murakami, T. Misawa, N. Kimura, T. Shida, H. Hoxie, J. A. O'Brien, W. Yamamoto, N. (1999): Type I helper cell (Th1) and Th2 preference of human immunodeficiency virus type I. *J. Virol.* 73:316-324.
3. Murakami, T. Lu, Z-H. Koyanagi Y. Tanaka, Y. Kim, J. Suzuki, Y. Minoguchi, S. Tamamura, H. Waki, M. Matsumoto, A. Fujii, N. Shida, H. Hoxie, JA. Peiper, SC and Yamamoto, N. (1999): Inhibitory mechanism of the CXCR4 antagonist T22 against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection. *J. Virol.* 73:7489-

4. Xiao, Y., Kuwata, T., Miura, T., Hayami, M., Shida, H. (2000): Dox-dependent SIVmac with tetracycline inducible promoter in the U3 promoter region. *Virology* In press.

5. Shida, H.: Regulation of mRNA transport of human retroviruses. *Recent Research developments in Virology*. In press.

「学会発表」

1. 博多義之、志田壽利 Rev と Rex の多量体化に関与する CRM1 の機能ドメイン 日本エイズ学会 1999

2. 博多義之、志田壽利 HIV Rev の多量体化における細胞性因子(hCRM1)の関与 日本ウイルス学会 1999

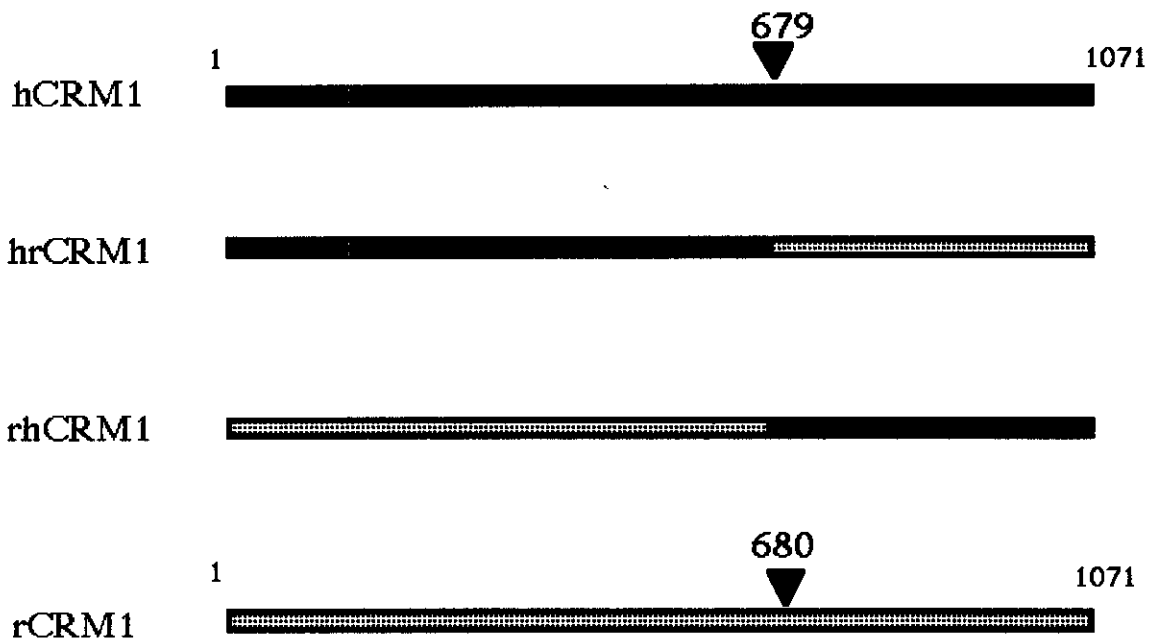
3. Hakata, Y., Shida, H.: A role of CRM1 family in HIV/HTLV-1 mRNA export. "Eukaryotic mRNA processing" Cod Spring Harbor 1999



☒ 1 Roles of Chimeric CRM1 in Rex and Rev

Rex				
	Activity	Binding	Multimerization	Export
hCRM1	+++	+++	+++	+++
hrCRM1	++	++	++	+++
rhCRM1	±	++	±	+++
rCRM1	±	++	±	+++

Rev				
	Activity	Binding	Multimerization	Export
hCRM1	+++	+++	+++	+++
hrCRM1	+++	+	+++	+++
rhCRM1	+++	+	+++	+++
rCRM1	+++	+	+++	+++



## 8. CXCR5/BLR1 の HIV-2 のコレセプターとしての研究

分担研究者 星野 洪郎 群馬大学医学部衛生学教授

本研究では、CXCR5/BLR1 が HIV-2 の新しいコレセプターであることを明らかにした。HIV-1 に対する感受性の異なる S+L-HOS 細胞のクローンで発現しているケモカインレセプターを同定する過程で CXCR5 の mRNA が S+L-HOS 細胞に発現していることを見出した。CXCR5 は、PBL、マクロファージでも発現していたが、9種類の T細胞株中、MT-2 以外には発現を検出できなかった。CXCR5 をクロニングし、発現ベクターに組み込み、更に NP-2/CD4 細胞に発現させ、HIV-SIV のコレセプターとなるか検討した。NP-2/CD4/CXCR5 細胞は、すべての HIV-2 に程度の違いはあるが感受性であった。しかし、色々の HIV-1 株、および SIV<sub>agm</sub>、SIV<sub>mac</sub>、SIV<sub>mdn</sub> には抵抗性であった。HIV-2 の感染は、CXCR5 のリガンドである BCA-1 でウイルス感染前に細胞を処理すると抑制された。また、CXCR5 に対する単クローン抗体の前処理でも抑制され、CXCR5 を介する感染であることが確認された。

### A. 研究目的

CXCR4、CCR5、CCR2b、CCR3、CCR8、APJ、GPR1 など 10 数種の G-protein-coupled receptor (GPCR) が HIV/SIV のコレセプターとして同定された。しかし、100 以上も報告されている GPCR のうち、どのような性質の GPCR が HIV/SIV のコレセプターになるかは十分には分かっていない。SIV については、HIV-1 とは使う主なコレセプターが違う可能性が報告されている。また最近になり CCR5 の N 末の細胞外ドメインのタイロシンが硫酸化されており、この硫酸化がコレセプター活性に重要であると報告された。

更に新しいコレセプターを同定することは、HIV/SIV の entry のメカニズムを明らかにするのに役に立つと考えられる。そこで、色々の細胞指向性の HIV/SIV に対して異なった感受性を示す S+L-HOS 細胞のクローンを用い、新しい HIV/SIV のコレセプターが同定できないか、まず GPCR の発現を縮合 PCR プライマーを用いた RT-PCR で検出した。次にそれが HIV/SIV のコレセプターとして働くか検討した。

### B. 研究方法

#### 1) 細胞

GPCR の発現は、S+L-HOS/CD4 細胞のクローン #4 と #8 を用いて、まず検討した。この他に C8166、MOLT-4、MT-2 ヒト T 細胞株、Raji 細胞株、U87/CD4、NP-2 グリオーマ細胞株、初代細胞としてヒト脳由来の BT-3、BT-20/N 細胞、および PBL、マクロファージなどを用いた。

#### 2) ウイルス株

HIV-1 株としては、GUN1v (BT cell で増える変異株)、GUN1wt (dual tropic)、IIB (T-tropic)、SF162、Ba-L (M-tropic)、HIV-2 株としては、ROD、GH-1、CBL21、CBL23、SIV 株としては、agm、mac、mdn を用いた。

#### 3) GPCR の発現の検出とクロニング

新しい GPCR の発現を RT-PCR で検出するため、chemokine receptor (CKR) の縮合プライマーを用いた。まず、色々の細胞から total RNA を抽出し、oligo (dT) と逆転写酵素を用い cDNA を合成した。縮合プライマーを用いて PCR を行い、アガロース電気泳動で PCR 産物を検出した。検出できた

PCR 産物を TA クロニングベクターに組み込み、塩基配列を決定した。検出された CXCR5 mRNA を PCR でクロニングするため、全コード領域が含まれるように PCR プライマーを設定した。

#### 4) CXCR5 発現細胞の樹立

CXCR5 cDNA を上記のプライマーを用いた PCR で増幅し、TA ベクターにクロニング後、レトロウイルス発現ベクター pMx-puro に導入した。pMx-puro/CXCR5 の DNA を packaging 細胞に導入し、pseudotype ウィルスを作り、更に NP-2/CD4 細胞に感染させ、puromycin 存在下で選択し、NP-2/CD4/CXCR5 細胞株を樹立した。導入した遺伝子 (CXCR4、CCR5 および CXCR5) の発現は、flow cytometry で行った。

#### 5) HIV/SIV の感染

NP-2/CD4、NP-2/CD4/CXCR5、NP-2/CD4/CXCR4、NP-2/CD4/CCR5、NP-2/CD4/CXCR5 細胞を 24-well plate 接種後、上記の各種の HIV/SIV を感染した。感染 8 日後まで培養し、2 日毎に感染の成立の程度を蛍光抗体法、あるいは培養上清中の逆転写酵素活性を測定し、判定した。感染成立の CXCR5 特異性を明らかにするためウイルス感染前にケモカインレセプターのリガンドである BCA-1、SDF-1 $\beta$ 、MIP-1 $\alpha$  で細胞を処理し、感染が抑制できるか検討した。同様に抗 CXCR5 モノクローナル抗体で細胞を前処理し、抗体の感染への影響を検討した。

### C. 研究結果

#### 1) GPCR 発現の検出

S+L-HOS/CD4 細胞をクロニングし、T-tropic HIV-1 の IIIB 株に抵抗性であるが GUN1v 株に感受性のクローンを分離した。このクローンで発現している GPCR は特別

なものが含まれている可能性が考えたので、その発現を調べた。Total RNA より cDNA を合成し、CKR の縮合プライマーを用いて PCR を行った。約 560 塩基対の PCR バンドが検出されたので、その断片を TA ベクターにクロニングし、4つのクローンを得、その塩基配列を決定した。3つのクローンは CXCR5 で、ひとつのクローンは CCR4 であった。

そこで CXCR5 が発現しているか、他の細胞でも RT-PCR で調べた (Fig. 1A)。CXCR5 の RNA は、PBL、マクロファージ、MT-2、Raji、脳由来 BT-3 の各細胞で陽性であった。C8166 と Molt4 の T 細胞株、グリオーマ株 U87/CD4、NP-2/CD4、脳由来 BT-20/N 細胞では陰性であった。

#### 2) CXCR5 の発現レベル

CXCR5 の発現量と CXCR4 の発現量を PCR で比較した (Fig. 1B)。4種の細胞株由来の cDNA を希釈して PCR を行い、どの程度検出できるか検討した。実験の結果から判定すると MOLT-4 や C8166 細胞で発現している CXCR4 のコピー数と比べ、S+L-HOS/CD4 および MT-2 細胞で発現している CXCR5 のコピー数は、約 1/10 倍と推定された。

#### 3) CXCR5 の flow cytometry による検出

Table1 に Flow cytometry の結果を示した。CXCR5 に関しては、S+L-HOS/CD4 細胞 (47%)、MT-2 細胞 (32%)、Raji 細胞 (58%) であった。MOLT-4 および C8166T 細胞は陰性であった。

PCR でクロニングした CXCR5 cDNA をレトロウイルスの発現ベクター pMx-puro にクロニングし、pseudo type ウィルスを作成し、NP-2/CD4 細胞に感染させた。Puromycin で選択し、NP-2/CD4/CXCR5 細胞を樹立した。Flow cytometry で CXCR5

の発現を確認した (Table 1)。90%以上の細胞が CXCR5 陽性と判定した。

#### 4) CXCR5 の HIV/SIV コレセプターとしての作用

NP-2/CD4/CXCR5 細胞と対象として NP-2/CD4/CXCR4 細胞、NP-2/CD4/CCR5 細胞を用い、色々の HIV-1、HIV-2、SIV 株を感染させた (Fig. 2)。NP-2/CD4/CXCR5 細胞には、HIV-2 の GH-1、ROD、CBL20、CBL23 株が感染したが、いずれの HIV-1 株も感染しなかった。SIV の agm、mac、mnd 株では、mnd 株のみごく少数の細胞に感染した。すなわち、CXCR5 は、HIV-2 に特異的なコレセプターとして作用した。

HIV-2 がよく感染した細胞では、著明な合胞体形成が認められた。また、培養上清中の逆転写酵素を測定すると経時的にウイルス産生が増加していることが分かった (Fig. 3)。

NP-2/CD4/CXCR5 細胞と、各種 HIV-1 株あるいは、SIV<sub>agm</sub>、SIV<sub>mac</sub> 感染 C8166T 細胞を混合培養し、cell-to-cell の感染が起こるか検討した。混合培養しても感染は成立しなかった。

#### 5) CXCR8 に対する単クロン抗体と CXCR5 のリガンドの感染への影響

CXCR5 に対するマウス単クロン抗体で、NP-2/CD4/CXCR5 細胞を前処理し、HIV-2 の ROD 株を感染させた (Fig. 4A)。1000 ng/mL の濃度の抗体で HIV-2 の感染が 90% 程度抑制された。次に CXCR5 のリガンド BCA-1 の感染への影響を同様に調べた (Fig. 4B)。1000 ng/mL の BCA-1 で感染は 90% 以上抑制されたが、SDF-1 $\beta$  や、MIP-1 $\alpha$  は 1000 ng/mL でも感染に影響を与えなかった。以上の結果で、HIV-2 が CXCR5 をコレセプターとして作用し、細胞に侵入することを再確認できた。

#### D. 考察

CXCR5 の発現はリンパ系組織で認められている。特に成熟 B 細胞やメモリー T 細胞に発現していると報告されている。Raji 細胞に発現している結果は、今までの報告と矛盾しない。一方、MT-2 細胞にも CXCR5 は発現していた (Table 1)。MT-2 細胞が T メモリー細胞の性質を示すか、今後、検討する必要があるであろう。

HIV-1 株は調べたかぎり、どの株も感染しなかった。実験室に適応した HIV-1 株は、T 細胞株を用いて継代されている。しかし、多くの T 細胞株は CXCR5 を発現していないと考えられる。CXCR5 をコレセプターとして用いる HIV-1 株は普通に培養で維持していると排除されてしまう可能性がある。

GPCR のうちどのような性質をもったものが HIV/SIV のコレセプター隣接するかは、十分には明らかでない。N 末端の細胞外ドメインに Tyrosine を含むものだけが HIV/SIV のコレセプターとして用いられている。しかし、CXCR2、CCR4、CCR7、GPR12、HM/45 は Tyrosine を同領域に含むがコレセプターとしては、働かなかった。これらの GPCR の間の違いはどこにあるか検討することも今後の課題である。

CXCR5 は、AIDS への進行する過程で PBL 中で異常に発現していることが報告されている。CXCR5 と HIV-1 の相互作用が AIDS への進行に関与しているかもしれないので更に検討が必要であろう。

#### E. 結論

ケモカインレセプター CXCR5/BLR1 が HIV-2 特異的なコレセプターであることがあきらかとなった。

F. 研究発表

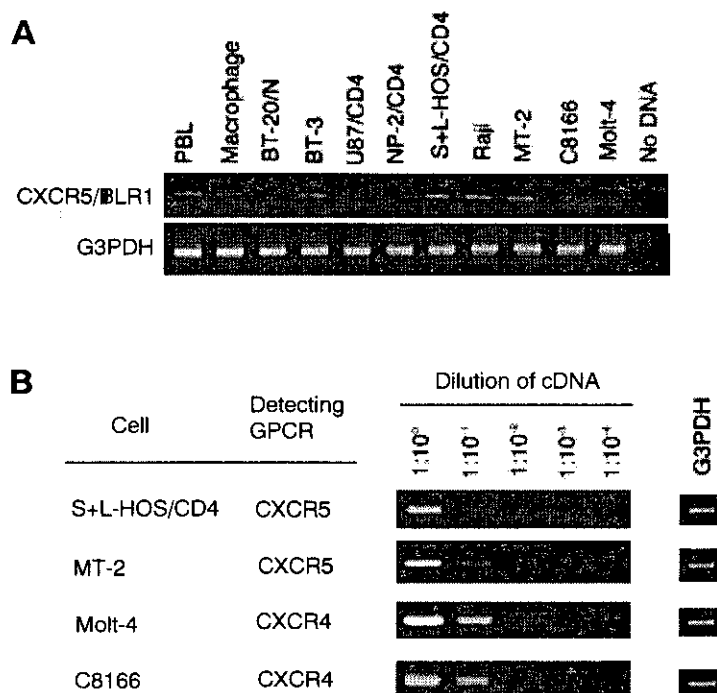
1. 論文発表

- (1) Shimizu,N., Soda,Y., Kanbe,K., Liu,Hy., Mukai,R., Kitamura,T., and Hoshino,H. (2000) A putative G protein-coupled receptor, RDC1, is a novel coreceptor for human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 74, 619-626.
- ( 2 ) Fu,DX., Jinno,A., Shimizu,N., Haraguchi,Y., and Hoshino,H. (1999) Isolation and characterization of a monoclonal antibody that inhibits HIV-1 infection. *Microbes. Infect.* 9, 677-684.
- ( 3 ) Kanbe,K., Shimizu,N., Soda,Y., Takagishi,K., and Hoshino,H. (1999) A CXC chemokine receptor, CXCR5/BLR1, is a novel and specific coreceptor for human immunodeficiency virus type 2. *Virology* 265, 5226-5231.
- (4) Haraguchi,Y., Sakurai,H., Hussain,S., Anner,BM., and Hoshino,H. (1999) Inhibition of HIV-1 infection by zinc group metal compounds. *Antiviral. Res.* 43, 123-133.
- (5) Jinno,A., Haraguchi,Y., Shiraki,H., and Hoshino,H. (1999) Inhibition of cell-free human T-cell leukemia virus type 1 infection at a postbinding step by the synthetic peptide derived from an ectodomain of the gp21 transmembrane glycoprotein. *J. Virol.* 73, 9683-9689.
- (6) Fang,D., Haraguchi,Y., Jinno,A., Soda,Y., Shimizu,N., and Hoshino,H. (1999) Heat shock cognate protein 70 is a cell fusion-enhancing factor but not an entry factor for human T-cell lymphotropic virus type I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 357-363.
- (7) Shimizu,N., Haraguchi,Y., Takeuchi,Y., Soda,Y., Kanbe,K., and Hoshino,H. (1999) Changes in and discrepancies between cell tropisms and coreceptor uses of human immunodeficiency virus type 1 induced by single point mutations at the V3 tip of the env protein. *Virology* 259, 324-333.
- (8) Soda,Y., Shimizu,N., Jinno,A., Liu,HY., Kanbe,K., Kitamura,T., and Hoshino,H. (1999) Establishment of a new system for determination of coreceptor usages of HIV based on the human glioma NP-2 cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 313-321.
- (9) Shimizu,N., Soda,Y., Kanbe,K., Liu,HY., Jinno,A., Kitamura,T., and Hoshino,H. (1999) An orphan G protein-coupled receptor, GPR1, acts as a coreceptor to allow replication of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in brain-derived cells. *J. Virol.* 73, 5231-5239.

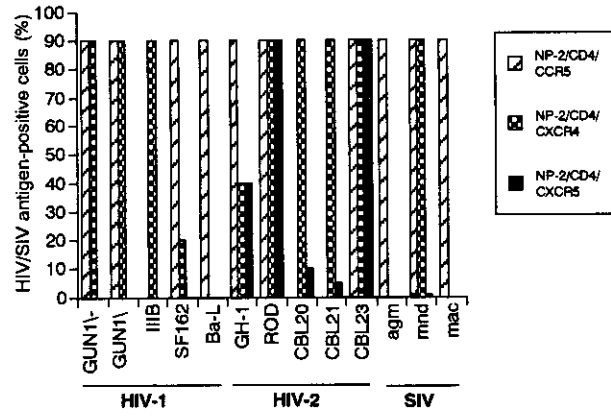
**TABLE 1 Expression of CD4 and CKRs on the cell surface**

Cell	CD4	CXCR4	CXCR5	CCR5
S+L-HOS/CD4	65 ± 12 <sup>a</sup>	32 ± 1	47 ± 2	11 ± 1
MT-2	89 ± 4	91 ± 11	36 ± 3	- <sup>b</sup>
Raji	-	70 ± 4	58 ± 5	-
Molt-4	38 ± 2	81 ± 3	-	-
C8166	79 ± 5	89 ± 6	-	-
-----				
NP-2/CD4	93 ± 5	-	-	-
NP-2/CD4/CXCR4	97 ± 3	95 ± 7	-	-
NP-2/CD4/CXCR5	89 ± 1	-	92 ± 5	-
NP-2/CD4/CCR5	93 ± 5	-	-	97 ± 7

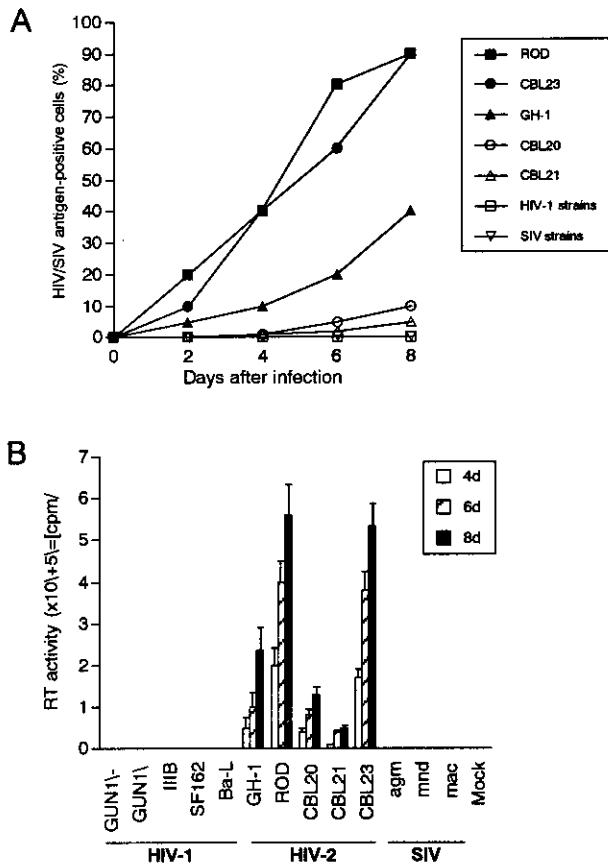
Expression of CD4 or CKRs on the cell surface was detected by FCM. Percents of CD4- or GPCR-positive cells were determined as described in Materials and Methods. a, mean ± SD (%) of duplicate experiments. b, -, <5 % of cells were positive.



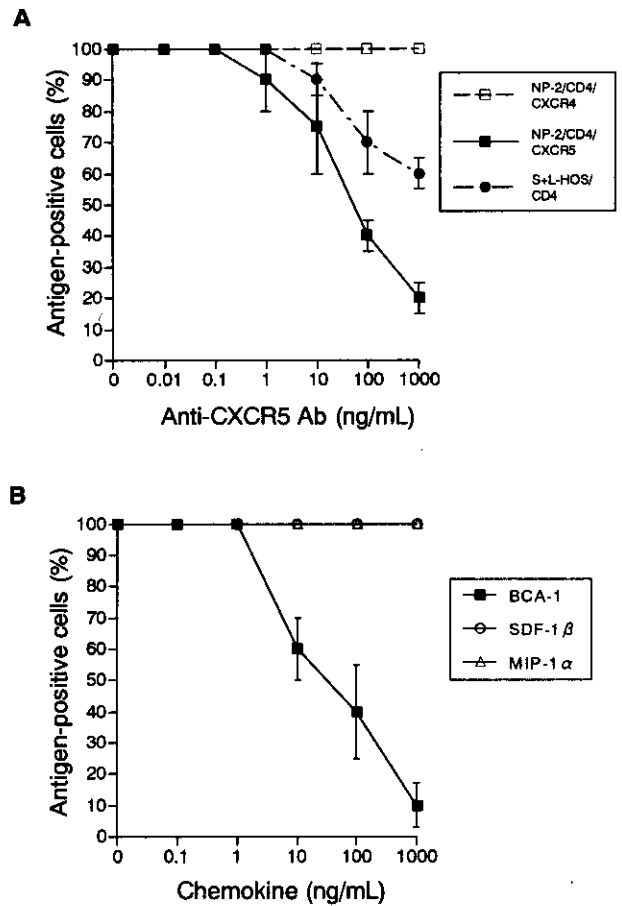
**Fig. 1 Detection of CXCR5 RNA by RT-PCR**



**Fig. 2** Infection of CXCR5-expressing cells with HIV/SIV



**Fig. 3** Time course of HIV/SIV infection



**Fig. 4** Inhibition of HIV-2 infection by anti-CXCR5 and CXCR5 ligand

## 9. HIV 転写制御剤の開発のための細胞性転写制御因子の解析

小林信之（長崎大学薬学部）

研究要旨；HIVの複製は宿主染色体に挿入されたHIVプロウイルス5'領域に存在するLTR部位に様々な宿主因子およびHIVtat遺伝子産物が作用して行われる。われわれはすでにHIV-LTR ENH領域の上流にENH活性を制御する領域UREを見い出している（J.Virol.65,6334,1991）。本研究ではURE結合タンパク質の種々ヒト細胞株での存在の確認とその部分精製を行った。

### A.研究目的

抗HIV剤の開発は従来からそのほとんどがHIV 特異的酵素を標的として行われてきており、現在までHIV 逆転写酵素阻害剤、HIV gag蛋白質分解酵素阻害剤が開発されてきた。このようなウイルス特異的酵素阻害剤を治療薬として開発することは細菌に対する抗生物質の開発同様、より宿主に副作用のない治療薬の開発が期待できるという利点を有しており、抗ウイルス薬開発の第一の選択肢である。しかしながらHIVは究めて変異を起こしやすいため、これら抗HIV剤に対する耐性株が容易に出現し、今日これら耐性株出現に対応するために多剤併用療法が行われるようになってきている。多剤併用取り分け今日 HAART(Highly active anti-retroviral therapy)として行われているものはそれまでの単剤による治療法に比べ画期的な効果を表わしているが、HIV感染症は他の多くのウイルス感染症と異なり、感染ウイルス遺伝子が宿主遺伝子に入り込んでしまうため、完全にウイルスを生体から排除することは究めて困難である。そのため抗ウイルス剤の投与は長期に渡っており、多剤併用による副作用の問題は

究めて深刻である。またこのような療法に於いても最近の報告では血中ウイルスコピー数は依然として有為に残存していることが明かとなっている。そこで本研究はHAART法の欠点を少しでも補うために従来開発されていない新しい抗HIV薬の開発を行うことを目的として、取りわけHIV転写制御薬の開発を目指している。

### C.方法

各種ヒト株化細胞より核抽出液を調整し、in vitroにおける放射標識合成UREオリゴヌクレオチドに対する蛋白の特異的結合活性をゲルシフト法により検出し、この活性を指標にURE結合蛋白の精製を行った。

### D.結果

図1に我々が既に報告したHIV-LTR URE領域(a)および実験に用いたURE合成オリゴヌクレオチド(b,c)を示した。<sup>32</sup>P標識合成オリゴヌクレオチドを用いて細胞核抽出液でのゲルシフトアッセイを行ったのが図2である。図2aでMOLT-4細胞核抽出液中に3本のバンドが検出されるが、そのうちの2本が特異的なバンドであることが明かとなった(b, c)。そこでこの特異的なバンドを



それぞれupper band, lower bandと名付けた。様々な細胞株中のURE結合蛋白の存在を同様にゲルシフト法で検索したものが図3でありその結果を判定量的に解析したのが表1である。この蹴っ課から明らかに細胞間の強弱はあるものもMOLT-4細胞核抽出液に見られたupper bandと同じ移動度を示すバンドが共通に検出された。しかしながらlower bandは各細胞で大きく異なっていた(図4)。そこで我々はMOLT-4細胞各抽出液からupper bandのURE結合蛋白の精製を試みた。URE結合蛋白の精製はゲルシフト法により活性をおいかけ、それぞれ細胞核抽出液、DE52, MOnoQ, Superose 6等を用いて行った。表2に精製の段階の一例が示してある。各抽出液にくらべ約600倍の比活性の上昇がみられる標品が得られたが、Superose 6の段階に於いてもまだSDS電気泳動で数本のバンドを含んでおりまだ活性分子の同定には至っていない。現在サウスウエスタン法により活性分子の同定を行っている。

#### E. 考察

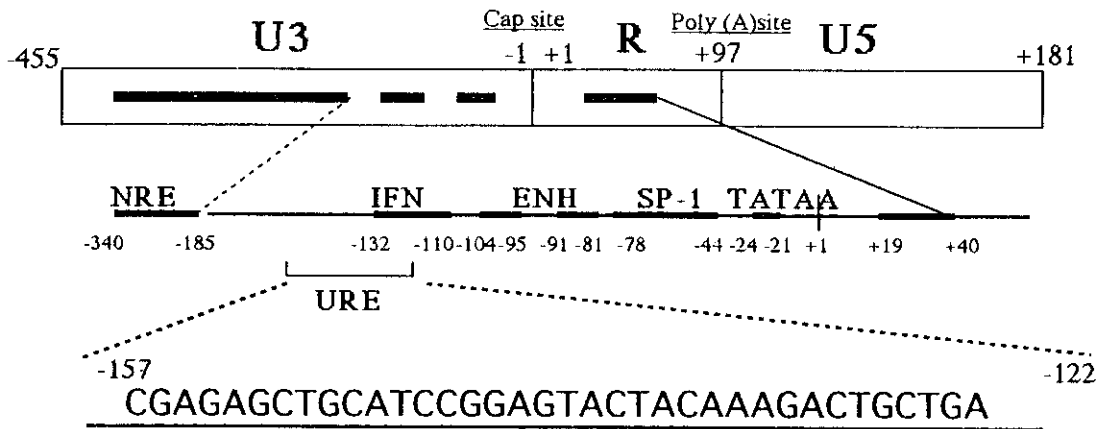
本研究では培養細胞核抽出液よりURE結合蛋白が普遍的に存在する可能性を得、ゲルシフト法で検出されたupper bandの精製を試みた。本年度の研究課程では比活性の上昇として約600倍の標品を得るまでに至ったが、依然としてSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法では複数のバンドが共存しており、URE結合蛋白の精製に至っておらず、さらに数ステップの精製が必要と考えられる。一方MOLT-4細胞で見出されたlower bandは細胞ごとに極めて様々なものが存在することが明かと

なった。このことはHIV転写の細胞間の効率の差異に寄与する可能性が考えられ、今後lower bandの精製とあわせて検討して行く必要がある。

#### F. 成果の発表

本年度は上記課題に関してはまだ該当する報告はできていない。

(a)



名取俊二, 中西義信 編集  
続医薬品の開発 第7巻 97-134 (1992)の図を改変

(b)

URE-H3 5'---CTAGATGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTACAAAGACT ---3'  
URE-H4 3'--- TACCGGGCTCTCGACGTAGGCCTCATGATGTTTCTGAGATC ---5'  
37bp (total 41bp)

(c)

NF-κB DNA

5'---AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC---3'  
3'---TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG---5'

22b.p.

Fig.1 HIV LTR

(a) HIVのLTRの構造とUREの配列. LTR : Long Terminal Repeat  
URE : Up-Regulatory Element (Nakanishi, Y., Y. Masamune, and N. Kobayashi. J. Virol. 65, 6334-6338 (1991))  
(b) URE DNA probeとして用いている oligonucleotideの配列. PAGE精製された single strand DNA をアニーリングさせ, double strand DNAをprobeとして用いている. (c) NF-κBの結合するDNA配列. ゲルシフトアッセイの中で competitorとして用いている, NF-κB結合領域を有するDNA.

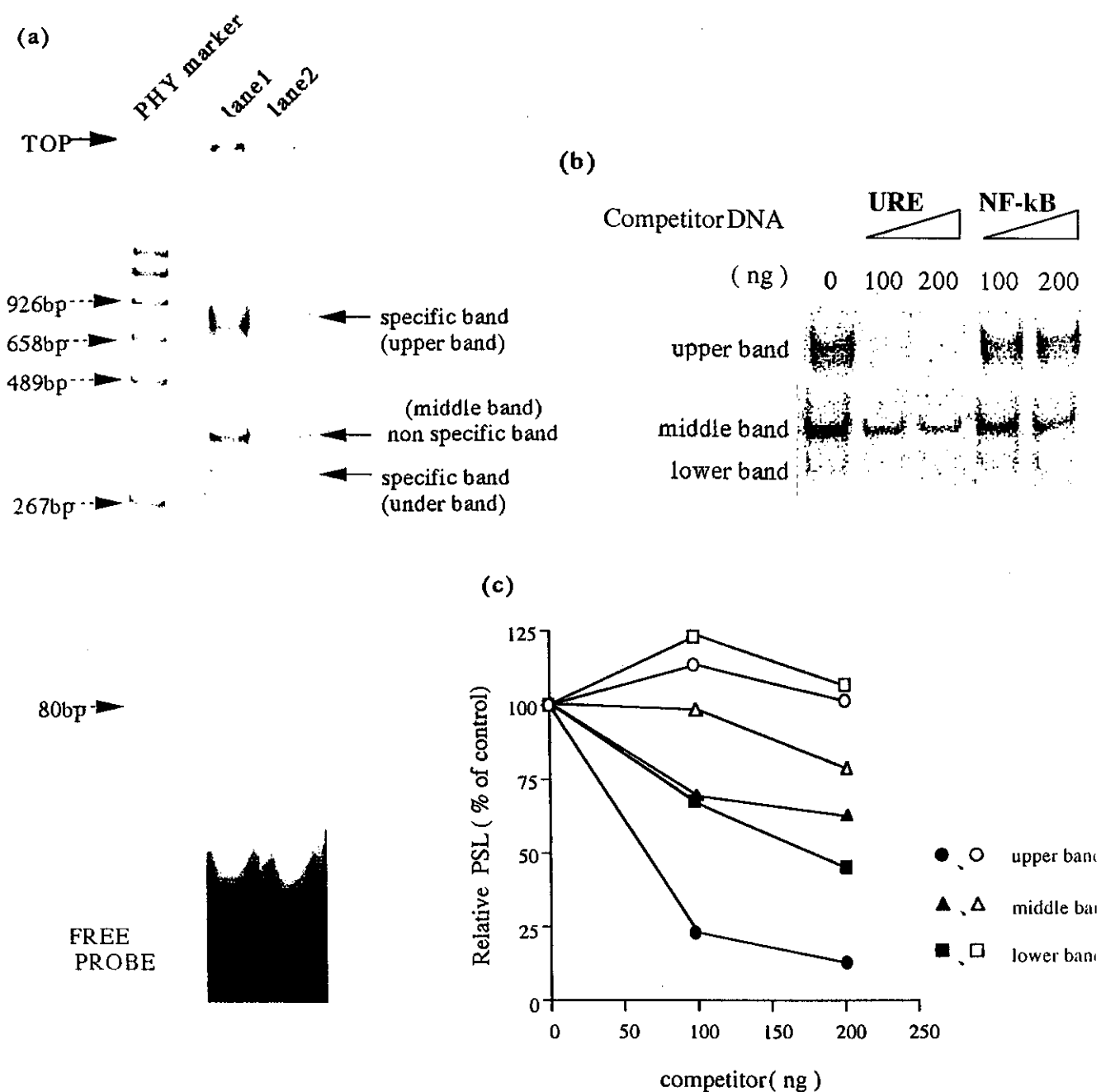


Fig.2 URE DNAへの特異的結合活性の検出.

(a)MOLT-4の核抽出液を用いたゲルシフト法による核抽出液のURE結合活性の同定. ラベルした<sup>32</sup>P-URE probeは1 ng加えており, lane2はcompetitorとして200ngのnon-label probeを加えている. reaction mixtureは30℃で10minインキュベートした後, 0.25xTBE bufferで4% polyacrylamide電気泳動をした. 左にはPHYマーカを示している. (b)同量の核抽出液に対して2種のcompetitor: URE, NF-kBを用いた実験結果. (c) (b)の結果をFuji MacBasを用いてバンド強度を定量したグラフ.

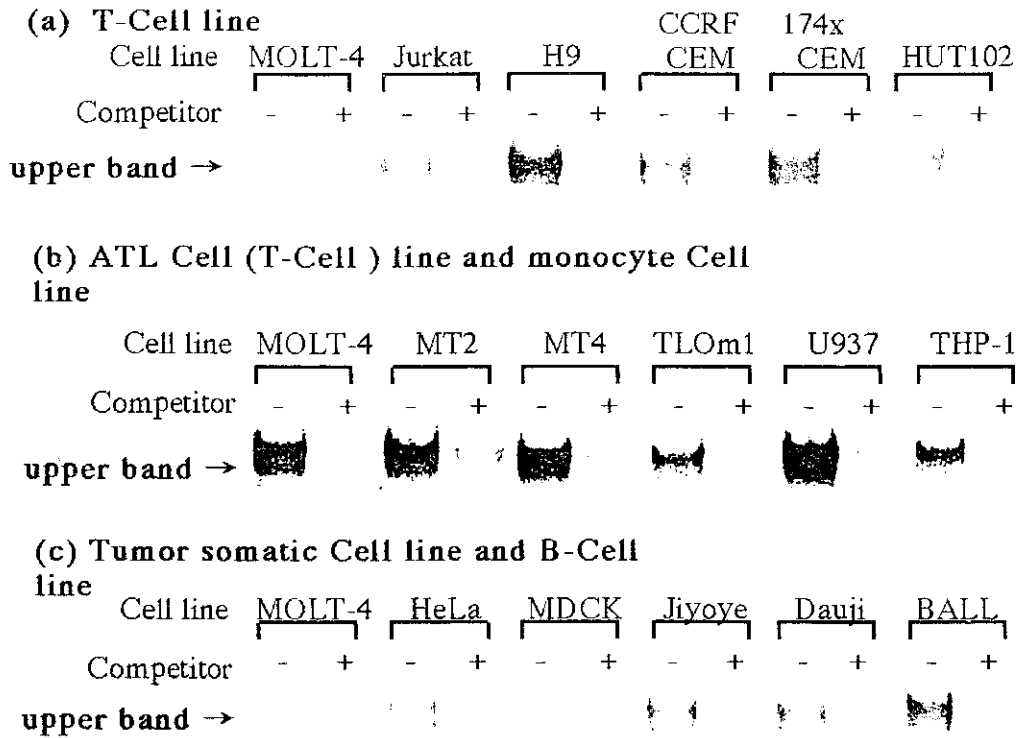


Table 1 MOLT-4と他の培養細胞核抽出液の upper band形成能の比較

Cell line	/ MOLT-4 (%)	Cell line	/ MOLT-4 (%)
<b>T Cell</b>		<b>B Cell</b>	
MOLT-4	1.00	Jiyoye	1.49
Jurkat	1.37	Dauji	1.53
H9	2.99	BALL	2.12
CCRF CEM	1.50	<b>Monocyte Cell</b>	
174xcCAM	2.31	U937	1.37
HUT102	1.28	THP-1	0.50
<b>ATL Cell (T Cell)</b>		<b>Tumor somatic Cell</b>	
MT2	1.22	HeLa	1.13
MT4	1.05	MDCK	0.81
TLOm1	0.59		

Fig.3 , Table 1 各種培養細胞における, URE-BP活性の検出

Fig.3 (a) T細胞、(b) ATL感染細胞、単球マクロファージ系細胞、(c) B細胞、組織細胞株を用いた。いずれも、ゲルシフト法によるupper bandの検出を示している。コントロールをMOLT-4細胞とし、特異的な結合性を示すために各々competitorを加えた(200倍)。Table1はupper bandのバンド強度をMacBassで解析し、コントロールに対する相対強度を示した。