

## 12. リンパ節で構成的に発現するケモカインの HIV 感染における役割

協力研究者 義江 修 (近畿大学医学部)

**研究要旨:** 2次リンパ組織で構成的に発現する CC ケモカイン SLC および ELC は CCR7 を介して PHA で刺激した PBMC での HIV-1 の増殖を促進するとともに、高濃度では細胞側に対しても IL-2 依存性増殖を有意に促進した。しかし IL-2 非存在下ではそのような増殖促進効果はまったくみられなかった。ヒトの CCR7 の N 末端細胞外ドメイン由来 17 アミノ酸ペプチドを免疫原として抗 CCR7 単クローン抗体 6B3 を作製した。この抗体は生細胞の染色に有用であった。ATL 細胞では CCR7 の発現が転写レベルおよび細胞表面で有意に亢進していることが示された。さらに ATL のなかでも臓器浸潤を示す症例で CCR7 の発現が強かった。臓器浸潤を示した患者由来の ATL 細胞は SLC や ELC により誘導される ICAM-1 への結合や細胞遊走が有意に亢進していた。HIV-2 でコレセプター特異性を決定する領域をマッピングするため gp120 に関して GH-1 (R5 タイプ) と ROD (X4 タイプ) のキメラウイルスを作製して検討した。その結果、HIV-2 でも gp120 の V3 領域がコレセプター特異性の主要な決定領域であり、さらに V3 領域の C 端側が重要であることが示された。

### A. 研究目的

HIV 感染では急性期のあと無症候期に入るが、そのような時期でもウイルスはリンパ節などの 2 次リンパ組織に潜伏し、活発に持続感染している。そのため、HIV 感染の真の姿を理解し、そのうえで有効な治療法を開発するためには 2 次リンパ組織での HIV 持続感染の分子メカニズムを明らかにすることが必須である。2 次リンパ組織では SLC や ELC などのケモカインが構成的に発現しており、リンパ球や樹状細胞などの組織内移動と細胞間相互作用を制御している。そのためこのような 2 次リンパ組織で構成的に発現しているケモカイン群が HIV の持続感染にさまざまなレベルで影響を与えている可能性が考えられる。そこで本研究では 2 次リンパ組織で構成的に発現するケモカイン群の HIV 持続感染における役割を多面的に明らかにすることを目的とする。これまでに CCR7 に作用する SLC や ELC が R5

および X4 のいずれのタイプの HIV-1 に対しても活性化 PBMC での増殖を促進することを明らかにした。今年度はさらに以下の項目について研究した。(1) SLC および ELC の活性化 PBMC そのものに対する作用。

(2) ヒトの CCR7 に対する単クローン抗体の作製。(3) ATL 細胞での CCR7 の発現とその役割の解析。(4) HIV-2 におけるコレセプター特異性の決定領域の同定。

### B. 研究方法

1. SLC および ELC の PBMC の増殖に対する影響は <sup>3</sup>H-thymidine 取込みおよび MTT 法でおこなった。
2. ヒトの CCR7 の N 末端細胞外ドメイン由来の 17 アミノ酸ペプチド (アミノ酸残基 32~48) をキャリアー蛋白 KLH にコンジュゲートして Freund's complete adjuvant とともにマウスに免疫し、常法にのっとりハイブリドー

マを作製した。

3. 正常人末梢血中の CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>リンパ球および ATL 患者末梢血中の CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>リンパ球 (>90%ATL 細胞) での CCR7 の発現は CCR7 の塩基配列に特異的なプライマーを用いた RT-PCR および抗 CCR7 単クローン抗体を用いた flow cytometry で解析した。また SLC および ELC に対する反応性は固相化 ICAM-1 に対する結合および細胞遊走で検討した。
4. HIV-2 の Rod 株および GH-1 株のコレセプター特異性は各種クローン化 CCR を発現した HeLa-CD4 細胞への感染後、上清中の RT 活性を測定することによって解析した。さらに Rod と GH-1 の間で gp120 に関するキメラウイルスを作製し、コレセプターに対する特異性を決定する領域を検討した。

### C. 研究結果

1. SLC および ELC は高濃度では PHA で刺激した PBMC の IL-2 依存性増殖を有意に促進した。しかし IL-2 非存在下ではそのような増殖促進効果はまったくみられなかった。また同時に調べて他のケモカインではそのような作用を示すものはなかった (図 1)。
2. ヒトの CCR7 の N 末端細胞外ドメイン由来の 17 アミノ酸ペプチドを免疫原として得られた抗 CCR7 単クローン抗体 6B3 は CCR1-7、XCR1、CX3CR1 をトランスフェクトしたマウス L1.2 細胞との反応性から CCR7 に特異的であった。この抗体は SLC による CCR7-L1.2 の遊走や細胞内カルシウム濃度上昇に対し影響しなかった。またウエスタンブロットや免疫組織染色では細胞質蛋白との交

差反応性を示した。そのためこの抗体は生細胞での CCR7 染色にのみ有用であると結論された。

3. HIV と同様に CD4 陽性 T 細胞に持続感染し、長い年月ののちに ATL を発症する HTLV-1 感染は HIV 感染のモデルとも考えられる。そこで手始めに ATL 細胞での CCR7 の発現を検討した。その結果、ATL 細胞 (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>) では正常の CD4<sup>+</sup>CD45R0<sup>+</sup>リンパ球と比較して CCR7 の発現が転写および細胞表面で有意に亢進している例が多かった (図 2)。さらに ATL のなかでも臓器浸潤を示さない症例と示す症例で比較すると後者の方が一般的に CCR7 の発現がより強かった (図 2)。そこで ATL 細胞での CCR7 の役割を LFA-1 の活性化による固相化 ICAM-1 への結合促進と細胞遊走アッセイで調べた。その結果、いずれのアッセイでも臓器浸潤を示した患者由来の ATL 細胞は正常 CD4 陽性メモリー T 細胞や臓器浸潤を示さない患者由来の ATL 細胞と比較して CCR7 のリガンドである SLC や ELC による ICAM-1 への結合誘導や細胞遊走が有意に亢進していた (図 3、4)。
4. HIV-2 Rod 株はコレセプターとしておもに CXCR4 を使い、CCR5 は使えない X4 型であるが、GH-1 株はおもに CCR5 を使い、CXCR4 は使えない R5 型である。そこで、HIV-2 でのコレセプター特異性の決定領域をマッピングするため、これらのコレセプター特異性に関してまったく異なる 2 つの HIV-2 モレキュラークローンを用いて検討した。すなわち、GH-1 のバックグラウンドで gp120 に関し GH-1 と ROD のキメラウイルスを作製

し(図5)、それらのコレセプター特異性を検討した。その結果、HIV-2でもgp120のV3領域がコレセプター特異性の主要な決定領域であり、さらにV3領域のC端側が重要であることが明らかになった(図6)。

#### D. 考察と結論

CCR7を介したシグナルが活性化PBMCのIL-2依存性増殖を促進することは、免疫応答において抗原刺激を受けたT細胞が2次リンパ組織でIL-2依存性に増殖するとき組織局所で構成的に産生されているSLCやELCが活性化T細胞の増殖をさらに促進することを示唆する。HIV-1感染に関しても、活性化T細胞のIL-2依存性増殖をさらに促進することにより、間接的にHIV-1の感染しやすい宿主細胞を増加し、それによってウイルスの増殖を間接的に促進している可能性が示唆される。すでに我々が見出したSLCやELCが活性化PBMCでのHIV-1の増殖を直接促進するという知見と合わせて、これらの2次リンパ組織で構成的に発現するケモカインはさまざまなメカニズムでHIV-1の2次リンパ組織での増殖を促進すると考えられる。

SLCやELCの役割を理解するうえでこれらの共有レセプターCCR7の発現を解析することは必須である。我々はCCR7に対する新規の単クローン抗体を作製し、この抗体が生細胞の膜染色に有効に使えることを明らかにした。そのため、この抗体はリンパ球の各サブセットでのCCR7発現を正常およびさまざまな病的状態で詳細に解析する新たな手段を提供する。ただしこの抗体は未知の細胞質蛋白との交差反応性のため組織

染色には使えず、そのためさらにそのような応用を可能とする新規の抗CCR7単クローン抗体の作製が望まれる。

RT-PCRおよび抗CCR7単クローン抗体を用いた解析から、組織での臓器浸潤性を示すATL症例ではATL細胞でのCCR7発現が亢進している傾向が見い出され、それと相関してSLCやELCに対するATL細胞の応答性も亢進していることが確認された。ATL細胞で発現しているCCR7は腫瘍細胞の臓器浸潤性に関与している可能性が示唆された。同様の解析をHIV感染細胞でする必要がある。

最後に、HIV-2でのコレセプター特異性にはHIV-1の場合と同様にgp120のV3ループ領域が重要であることが見い出され、この領域を標的とする感染抑制法の有用性があらためて確認された。

#### E. 研究発表

1. Nagira A, Sato A, Miki S, Imai T, Yoshie O (1999) Enhanced HIV-1 replication by chemokines constitutively expressed in secondary lymphoid tissues. *Virology* 264: 422-426
2. Isaka Y, Sato A, Miki S, Kawauchi S, Sakaida H, Hori T, Uchiyama T, Adachi A, Hayami M, Fujiwara T, Yoshie O (1999) Small amino acid changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology* 264: 237-243
3. Hasegawa H, Nomura T, Kohno M, Tateishi N, Suzuki Y, Maeda N, Fujisawa R, Yoshie O, Fujita S (2000) Increased chemokine receptor CCR7/EBI1 expression enhances the infiltration of lymphoid organs by adult T-cell leukemia cells. *Blood* 95: 30-38

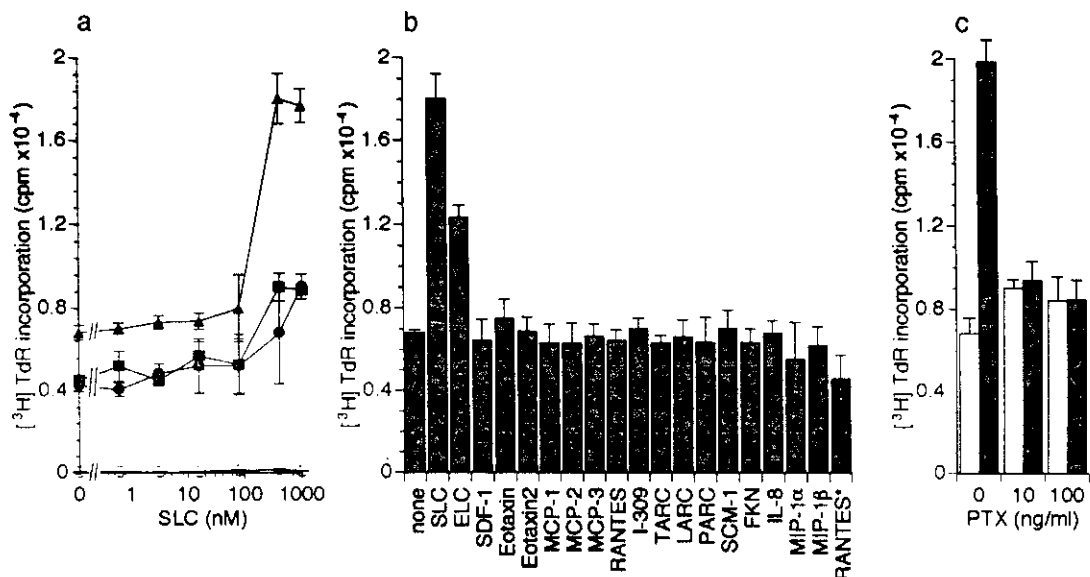


図1。SLCおよびELCによる活性化PBMCのIL-2依存性増殖に対する促進作用。PHAで2日刺激したPBMCを洗浄し、その後3日間20 units/mlのIL-2存在下で培養した。洗浄した後、96穴マイクロプレートに $2 \times 10^5$  cells/wellでまき、(a)では、IL-2非存在下(○)、20 units/mlのIL-2存在下(●)、100 units/mlのIL-2存在下(■)、500 units/mlのIL-2存在下(▲)、で48時間培養し、最後の6時間で<sup>3</sup>T-thymidineの取込みを測定した。また(b)では500 units/mlのIL-2存在下でさまざまなケモカインを400 nM(RANTESのみ1 μM)加えて48時間培養し、最後の6時間で<sup>3</sup>T-thymidineの取込みを測定した。(c)では各濃度の百日咳毒素(PTX)で90分前処理したのち500 units/mlのIL-2とSLC非存在(白カラム)あるいは400 nMのSLC存在下(黒カラム)で48時間培養し、最後の6時間で<sup>3</sup>T-thymidineの取込みを測定した。実験はトリプレケートで行い、結果は3回の実験からの代表で示した。

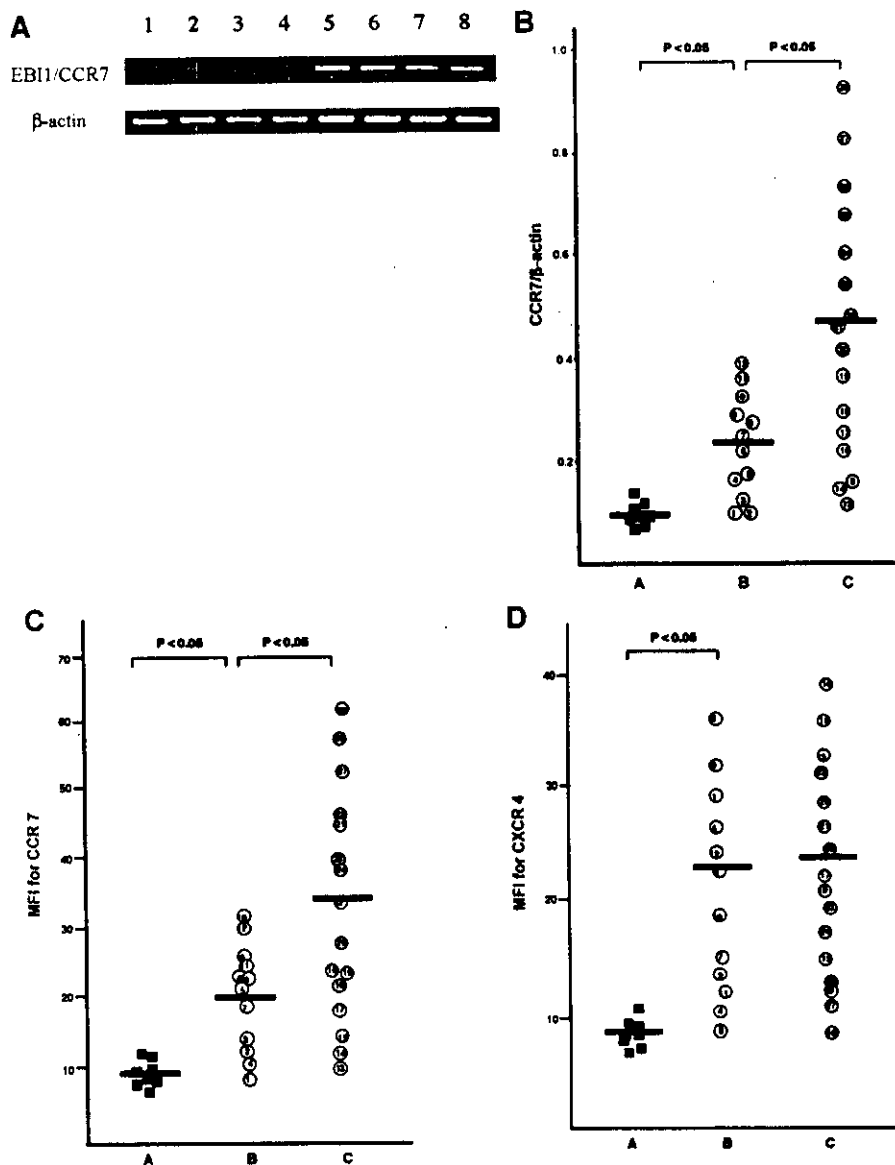


図2。ATL細胞でのCCR7発現の増強。正常人末梢血由来のCD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞およびATL患者由来のCD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞(>90%以上ATL細胞)についてCCR7の発現をRT-PCRおよび抗CCR7単クローン抗体を用いたflow cytometryで測定した。(A)CCR7と $\beta$ -actinに対するRT-PCR。1、正常人；2~4、臓器浸潤のないATL患者；5~8、臓器浸潤のあるATL患者。(B)(A)で示したRT-PCRからCCR7のシグナルと $\beta$ -actinのシグナルの強さを測定し、その比を表示した。A、正常人；B、臓器浸潤のないATL症例；C、臓器浸潤のあるATL症例。(C)CCR7に対する単クローン抗体、あるいは(D)CXCR4に対する単クローン抗体、で細胞表面を染色し、蛍光強度の平均をプロットした。A、正常人；B、臓器浸潤のないATL症例；C、臓器浸潤のあるATL症例。

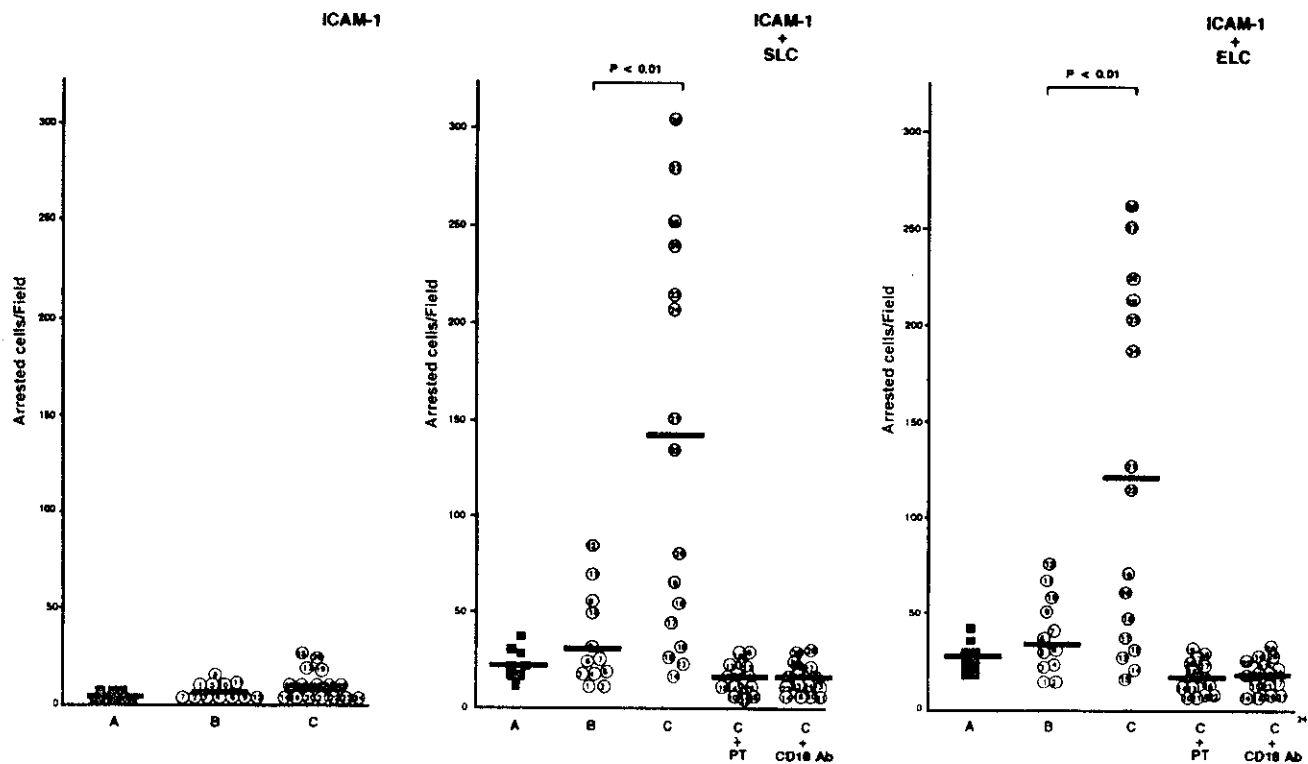


図3。流液中での固相化 ICAM-1 への細胞吸着に対する SLC および ELC の効果。ICAM-1 のみ (左)、ICAM-1 と SLC (中央)、あるいは ICAM-1 と ELC (右) でコートした培養器表面への細胞の吸着を流液中で測定した。A、正常人由来 CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞；B、臓器非浸潤性の ATL 症例由来 CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞；C、臓器浸潤性の ATL 症例由来の CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞。臓器浸潤性の ATL 症例由来 CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞についてはさらに 100 ng/ml の百日咳毒素 (PT) で 37°C1.5 時間、あるいは 20 μg/ml の抗 CD18 抗体で室温 20 分前処置した場合も行った。

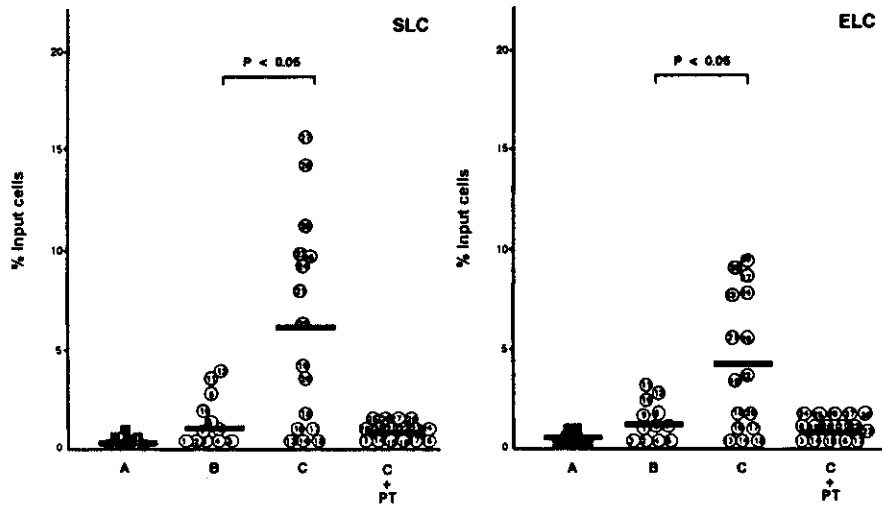


図4。SLCおよびELCに対する細胞遊走。A、正常人由来CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞；B、臓器非浸潤性のATL症例由来CD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞；C、臓器浸潤性のATL症例由来のCD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞。臓器浸潤性のATL症例由来のCD4<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>メモリーT細胞についてはさらに100 ng/mlの百日咳毒素（PT）で37℃1.5時間前処置した場合も行った。

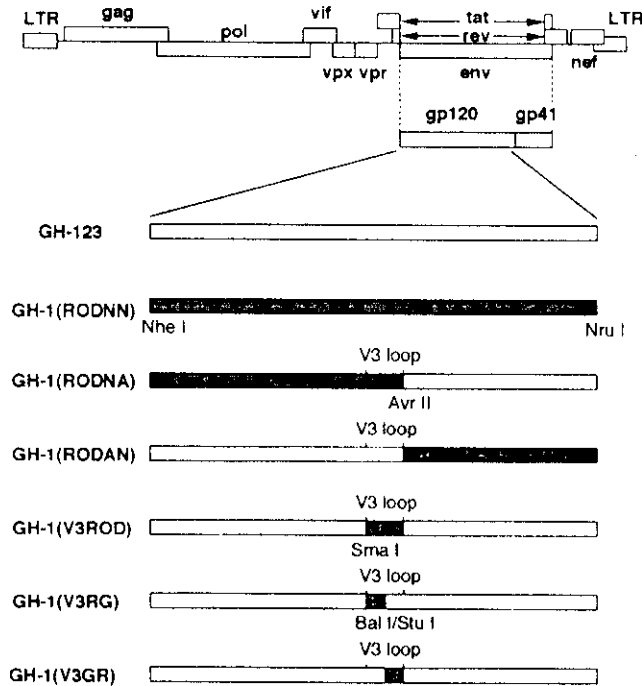


図5。HIV-2 GH-1株の gp120 領域を全部あるいは一部 HIV-2 ROD株の gp120 領域と組換えたキメラウイルスの模式図。

Virus	V3 loop amino acid sequence	Net charge	Coreceptor
HIV-2 <sub>ROD</sub>	CKRPGNKIVKQIMLSGHVVFHSHYQPI-NKRPRQAWC 1 10 20 30 36	+10	CXCR4
HIV-2 <sub>GH-1</sub>	T VP T L -- - T	+6	CCR5
GH-1(V3RG)	L -- - T	+7	CCR5
GH-1(V3GR)	T VP T -- -	+9	CXCR4
HIV-2 <sub>UC2</sub>	T VP T R -- AVI K	+10	CXCR4
HIV-2 <sub>ST</sub>	T VP T L -- - R	+7	CCR5
HIV-2 <sub>UC1</sub>	R T IP TI LN -- L- T	+6	CCR5
SIV <sub>MAC239</sub>	R T LPVTI L -- - D K	+6	CCR5
SIV <sub>AGM212</sub>	R T LPVTI A L -- KY- MKL	+7	CCR5

図6。HIV-2 ROD株、GH-1株およびこれらの中で作製した V3 領域のキメラウイルスについて、V3ループのアミノ酸配列とコレセプター特異性を示した。さらにコレセプター特異性が報告されている HIV-2株および SIV株の V3ループのアミノ酸配列とコレセプター特異性についても合わせて示した。



### 13. HIV-1 Rev 蛋白によるウイルス mRNA 核外輸送の分子機作の解析

分担研究者 木村富紀 (関西医科大学 微生物学講座 助教授)

#### 研究要旨

これまでに HIV-1 Rev により調節されるイントロン陽性の gag mRNA の核外輸送に対し、核内  $\beta$ -アクチン線維束が機能的に関与することを明らかにした。今回、このアクチンを介したウイルス mRNA の輸送に関わる分子機作の検討を目的として、gag mRNA の核外輸送に対するエネルギー依存性の有無を検討した。その結果、同 mRNA の核外輸送は温度依存性であり、その輸送は 4°C で阻害されることが観察された。これは少なくとも、Rev と CRM1 間の複合体形成が温度依存性に生じ、4°C ではその結合が著しく低下するためと考えられた。さらに、hexokinase や GTP $\gamma$ S と AMPPNP の併用により Rev-CRM1 間の複合体形成は抑制されたことから、この複合体形成はエネルギー依存的であり、しかも GTP の加水分解を必要とすることが明らかになった。この結果は、核内に GAP 活性を有する分子の存在を示唆する。核内には RCC1 が存在することから、Rev-RRE mRNA 輸送複合体には RCC1/GAP による GTP-GDP 変換サイクルが連続して作用することが予想され、一連の GTP 加水分解により産生されるエネルギーがアクチン上の移動のための動力となる可能性が想定された。

#### A. 研究目的

HIV-1 の増殖制御を図る上で不可欠な知識と考えられる、ウイルス調節蛋白 Rev による構造遺伝子 mRNA の発現調節機序を知る目的で、同 mRNA の核外輸送に対し Rev 依存性に関わる細胞固有の RNA 輸送機構を検討すると共に、これを構成する細胞因子の分子作用機作の解析を行う。

#### B. 研究方法

RNA-fluorescence *in situ* hybridization と免疫蛍光法を併用し、RRE RNA と Rev 或いは RNA 輸送

に関わる細胞因子の細胞内局在の同異を検討した。この検討を通じ RRE RNA-Rev 複合体と共存が明らかになった、核内 F-アクチンによる同複合体輸送への関与の有無を知る目的で、核内アクチンの重合阻害がウイルス RNA の輸送に及ぼす影響を RT-PCR により解析した。次いで、アクチンを介したウイルス RNA 輸送におけるエネルギー依存性を知る目的で、同輸送の温度感受性を RT-PCR により、輸送複合体形成の温度感受性を GST-Rev の免疫共沈降により検討した。

#### C. 研究結果

- 1) HIV-1 *gag* mRNA と Rev、CRM1 [Rev 核外輸送シグナル(NES)に対する受容体]、Ran-GTPase は核内 F-アクチン上で NES 依存性に共存を確認した (Kimura *et al.* 2000)。
- 2) G-アクチンに特異的に結合し、F-アクチンを脱重合する LatrunculinB (LAT-B)を作用させたところ、上記細胞因子の共存は消失し (Kimura *et al.* 2000)、*gag* mRNA の核外輸送は阻害された (図 1)。
- 3) この輸送阻害効果は可逆的であり、LAT-B 除去後遺伝子導入細胞は *gag* mRNA 輸送を再開した。そこで、この細胞を 4°C に置いたところ、37°C に置いた場合とは異なり、RNA 輸送の再度の阻害が認められた。以上の結果から、RRE RNA-Rev 複合体の輸送は温度感受性であると結論した (図 2)。
- 4) GST-Rev に核抽出液を加え共沈する CRM1 を指標に Rev-CRM1 複合体形成の温度感受性を検討したところ、両者の結合は 4°C では観察されなかった (図 3)。
- 5) Rev-CRM1 複合体と温度依存性に共沈する核内因子として p470, p320, p52 が観察された (図 4)。
- 6) Rev-CRM1 複合体の形成は、hexokinase/glucose の存在下に阻害された(図 5)。この形成はまた、GTP $\gamma$ S 濃度依存性に抑制され、AMPPNP の併用によりその増強が

観察された (結果省略)。

- 7) イントロンレスの luciferase (*luc+*) mRNA の核外輸送は、RRE mRNA の輸送と同様 CRM1 と GTP 結合型 RanGTPase を必要とし、LAT-B により阻害された。また、その輸送は温度依存性であることが観察された (Kimura *et al.* submitted)。

#### D. 考察

一般的に mRNA は、単純拡散によりエネルギー非依存的に核外輸送されると考えられる。これに対し、イントロンを含む Rev 依存性の RRE mRNA 並びにイントロンレスの *luc+* mRNA の核内 F-アクチンを介した輸送は、拡散によらず能動的に生じることが示唆された。RRE mRNA 輸送の場合、能動輸送の機序として、一つには輸送に関わる核内細胞因子と Rev 間の複合体形成が GTP 加水分解の結果生じるためと考えられた。このことは、核内に GTPase 活性化蛋白(GAP) の存在を示唆する。核内にはもともとグアニン交換因子である RCC1 が存在するため、Rev-RRE mRNA 輸送複合体には GAP/RCC1 により GTP-GDP 変換サイクルが連続して作用すると予想され、一連の GTP 加水分解により生じるエネルギーがアクチン上を移動するための動力となる可能性が考えられる。

## E. 結論

HIV-1 *gag* mRNA 並びに *luc+* mRNA は、核質内をアクチンを介しエネルギー依存性に能動輸送されることが考えられ、その分子機作として一つには GTP 加水分解を必要とする輸送複合体形成の関与があることを明らかにした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kimura, T., Hashimoto, I., Nishikawa, M., Fujisawa, J.-I.: Rev-dependent association of the intron-containing HIV-1 *gag* mRNA with the nuclear actin bundles and the inhibition of its nucleocytoplasmic transport by latrunculin B. *Genes Cells* In press.
- 2) 木村富紀：13 章共焦点走査型レーザー顕微鏡の原理と使い方の実際 初心者のための研究室実験マニュアル（河本圭司編集）137-145、金芳堂、京都、2000.
- 3) Kimura, T., Nishikawa, M., Fujisawa, J.-I.: Temperature-sensitive export of the luciferase mRNA via a pathway used by the human immunodeficiency virus Rev protein: requirement of RanGTP and inhibition by leptomycin B and

latrunculin-B. Submitted.

### 2. 学会発表

- 1) Kimura, T., Hashimoto, I., Yamamoto, A., Nishikawa, M., Fujisawa, J.-I.: Involvement of nuclear F-actin in the transport of HIV-1 pre-mRNA in response to Rev-NES complexed with CRM1 and Ran. *Mol. Biol. Cell Suppl.* **10**: 441a, American Society for Cell Biology 39th annual meeting, Washington, D.C., USA 2000
- 2) 木村富紀、橋本岩男、山本章嗣、西川正雄、藤澤順一: HIV-1 Rev 蛋白によるウイルス pre-mRNA の核外輸送における核内 F アクチンの機能的関与、第 22 回日本分子生物学会年会、福岡、2000
- 3) 木村富紀、橋本岩男、西川正雄、藤澤順一: Rev により調節されるイントロン陽性 HIV-1 mRNA の核外輸送に果たす Ran-GTPase と GTP 加水分解の役割、日本ウイルス学会第 47 回学術集会・総会、横浜、2000

図1 LAT-BによるRev依存性gag mRNA核外輸送の抑制

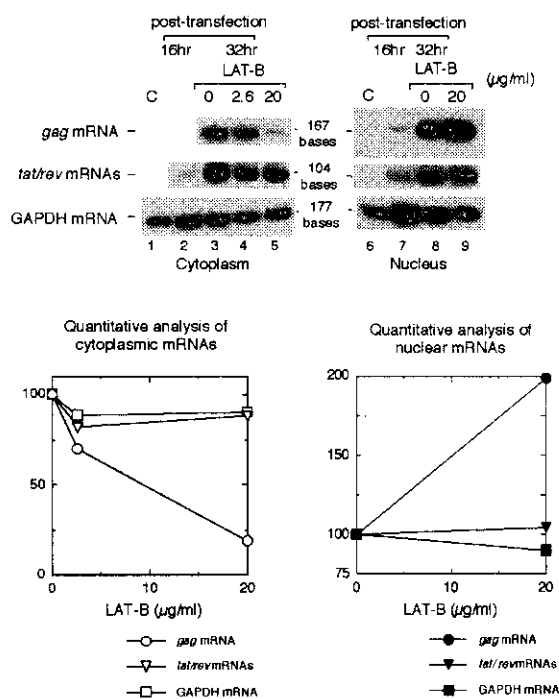


図2 温度依存性に生じるgag mRNAの核外輸送

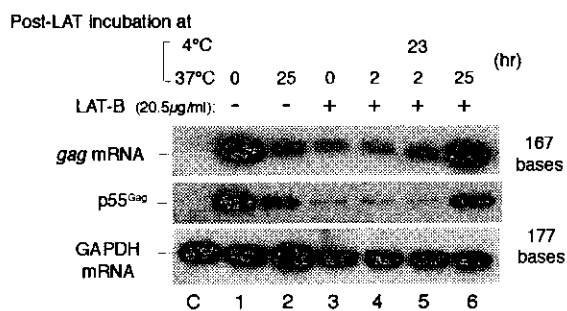


図3 温度依存性のRev-CRM1複合体の形成

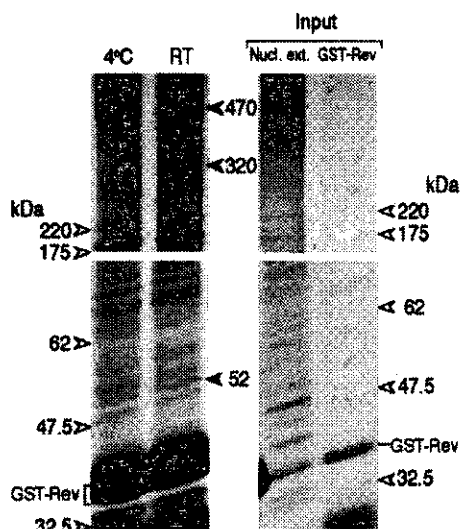
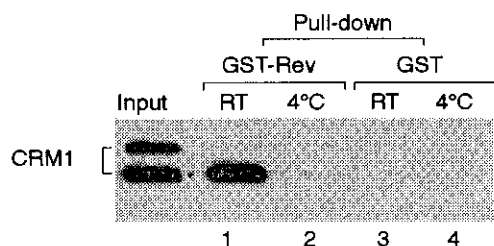
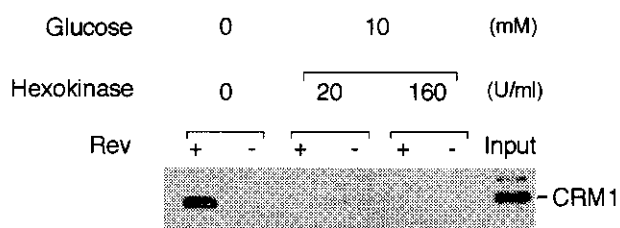


図4 Rev-CRM1複合体と温度依存性に共沈する核内因子

図5 エネルギー依存性のRev-CRM1複合体の形成



## 14. インテグラーゼを標的とした HIV-1 阻害剤の開発に関する研究

研究協力者 増田貴夫 (東京医科歯科大学大学院医学系研究科)

研究要旨：HIV1 インテグラーゼ (IN) の酵素活性中心あるいは LTR 末端配列に変異を導入したインテグレーション能欠損変異体解析から、ヒト末梢血由来リンパ球 (PBL) あるいはマクロファージにおいてもインテグレーションはウイルスの複製に必須であることを確認した。また、その他の IN 変異体解析から、IN はインテグレーション以外にも逆転写および核移行機能にも関与している可能性を示唆する結果を得た。さらに、インテグラーゼ変異体によるトランスドミナントネガティブ効果すなわち、ウイルス複製抑制効果を確認した。

## A. 研究目的

HIV-1 ウイルス酵素であるインテグラーゼの機能ドメインおよびその基質としてのウイルス DNA LTR 末端配列を種々の変異体解析より、インテグラーゼの新たな機能の同定及びこれら種々の変異体によるウイルス抑制効果を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

種々のインテグラーゼ変異体を作製し (図 1)、ウイルス複製における新たな機能ドメインをヒト末梢血由来初代継代細胞を感染標的細胞としてウイルス学的性状解析を行った。以上により得られたインテグラーゼ変異体によるウイルス抑制効果をヘルパーウイルスを用いて検討した。

## C. 研究結果

ヒト末梢血由来初代継代細胞 (PBL および Mφ) においてもインテグレーションは HIV の複製に必須であることを確認した (図 2)。また、インテグラーゼの新たな機能としての核移行機能を確認した (図 4)。また、逆転写反応に影響を及ぼす変異体 (K 1 8 6 Q、ΔK R K) 非分裂細胞であるマクロファージにおいて影響が強く現れる変異体 (Y 1 4 3 G) も得られた (図 3)。以上の変異体のウイルス複製抑制効果を調べたところ、酵素活性中心変異体 (D116G)、および N 末端変異体 (C43L) により、ウイルス感染効率抑制 (80~90% 低下) を認めた (図 5)。

## D. 考察

インテグラーゼはウイルス遺伝子を染色体に組み込む酵素であるが、それ以外にもウイルス複製において、逆転写および核移行機能に関与しているとも考えられた (図 6)。また、インテグラーゼ変異体によるウイルス複製抑制効果を確認した。以上、インテグラーゼの酵素活性のみならず、新規機能ドメインを標的とした HIV 阻害剤開発にむけて、あらたな展望が期待される。

## E. 研究発表

[論文発表]

1. Nakamura T., Masuda T., Goto T., Sano K., Nakai M. and Harada S. Lack of infectivity of HIV-1 integrase zinc finger-like domain mutant with morphologically normal maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239, 715-722. 1997.
2. Masuda T., Kuroda M.J., & Harada S. Specific and independent recognition of U3 and U5 att sites by HIV-1 integrase in vivo. *J. Virol.* 72: 8396-8402, 1998.
3. Tsurutani N., Kubo M., Maeda Y., Ohashi T., Yamamoto N., Kanagi M., & Masuda T. Identification of Critical Amino Acid Residues in HIV-1 IN Required for Efficient Proviral DNA Formation at Steps Prior to Integration in Dividing and Non-dividing Cells. (*J. Virol.* in press).

[学会発表]

4. 増田貴夫 “HIV インテグラーゼの構造と機能。” HIV/AIDS 研究合同発表会 (1999年、東京)

5. 鶴谷直美、久保誠、山本直樹、神奈木真理、増田貴夫

“ヒト末梢血由来マクロファージ感染系における HIV-1 インテグラーゼの役割。” 第47回 日本ウイルス学会 (1999年、横浜)

6. Masuda T., Tsurutani N., Yamamoto N., & Kanagi M. Critical amino acid residue in HIV-1 IN required for efficient proviral formation in monocyte-derived macrophage: implication for nuclear transport function of IN. Cold Spring Harbor Retrovirus Meeting (1999. New York).

## 図の説明文

## 図1. インテグレーション変異体

A) HIV-1 IN mutants: HIV-1 インテグラーゼ (IN) は全長288個のアミノ酸残基より構成され、構造的に A:N 末端 Zn 結合ドメイン (1-50)、B:酵素活性ドメイン (51-212)、C:非特異的 DNA 結合ドメインに分けることができる。本研究では、保存されるアミノ酸に点もしくは欠損変異を導入した(太文字)

B) att deletion mutant (U3&U5DEL10): インテグレーションに必要とされる LTR 末端配列 (att、矢印) を欠損させた変異体を示す。

図2. インテグレーション変異体の PBL、MDMにおける遺伝子発現。各インテグレーション変異体を RD (human rhabdomyosarcoma)、ヒト末梢血リンパ球 (PBL)、単核球由来マクロファージ (MDM、Mφ) に感染させ、3, 7日目の細胞内のウイルス遺伝子発現をルシフェラーゼ活性により測定した。HIV-1 IN の酵素活性中心変異体 (D116G) あるいは att 欠損変異体 (3 & 5 DEL10) は親株 (WT) とくらべて0.5%以下であった。また、HIV-1 N末端変異体 (C43L) では、有意なルシフェラーゼ活性は検出できなかった。したがって、インテグレーションは HIV-1 の複製に必須であることをヒト末梢血由来 PBL, MDMでも確認した。

図3. HIV-1 IN 変異体の分裂および非分裂細胞への感染性。新たに作製した HIV-1 IN 変異の影響を分裂細胞 (RD) および非分裂細胞 (MDM) に感染させ、感染後4日目のウイルス遺伝子発現をルシフェラーゼ活性により測定した。核移行シグナルと考えられていた KRK (186-188) 変異体は両細胞において全く感染成立しなかった。保存されている

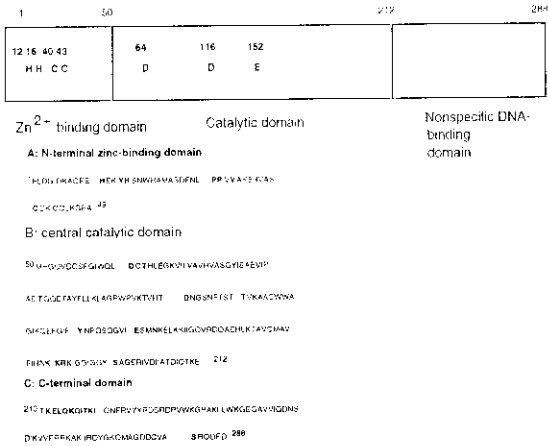
Y143 変異の影響は分裂細胞 (RD) により非分裂細胞 (MDM) にて顕著に現れることを認めた。他の T、もしくは、S 残基の変異に関しては、若干の感染性の低下が認められた。

図4. HIV-1 IN 蛋白の核局在性。HeLa 細胞に GFP (コントロール) あるいは GFP-IN 融合蛋白発現ベクターを導入し、24時間後共焦点顕微鏡により、各蛋白の細胞内局在性を検討した。その結果、HIV-1 GFP-IN の核局在を確認した。

図5. IN 変異体によるトランスドミナントネガティブ効果。IN 変異体の HIV-1 複製における抑制効果を調べるために、各変異 IN を導入した、ヘルパーベクターを構築した。この変異ヘルパーベクターを HIV-1 クローン (pNL43lucΔBgl) とエンベロープ発現ベクター (pJD-1) と共に COS あるいは、293T 細胞にトランスフェクションし、2日目の培養上清を RD 細胞に感染させ、3~4日目の Luc 活性を調べた。値は、野生株ヘルパーを導入したときの Luc 活性を100%とし、相対値で表した。酵素活性中心変異体 (D116G) で16~20%、N 真端変異体で1~9%まで低下した。

図6. まとめ。HIV-1 IN はウイルス遺伝子組み込み以外にも、逆転写、核移行等にも機能的に関与しているモノと考えられた。各 IN 変異体により、ウイルス感染初期過程を効率よく阻害しうることを明らかにした。

A) HIV-1 IN mutants



B) att deletion mutant (U3&U5DEL10)

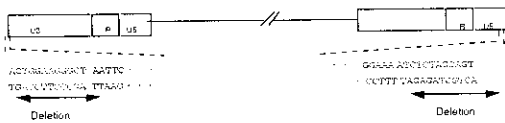


図1. インテグレーション変異体

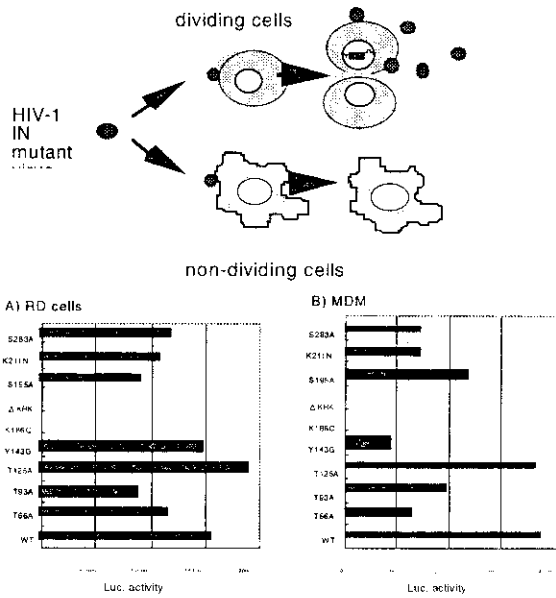


図3. HIV-1 IN変異体の分裂および非分裂細胞への感染性

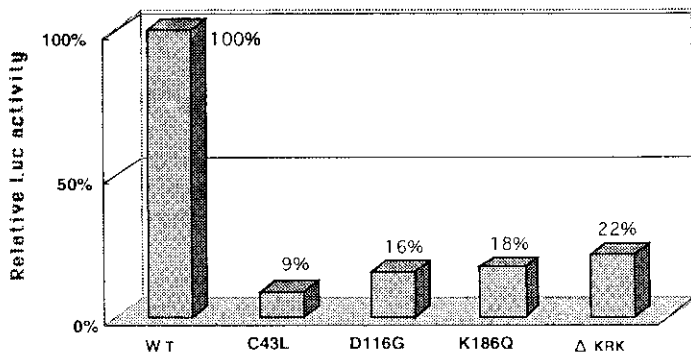


図5. IN変異体によるトランスドミナントネガティブ効果

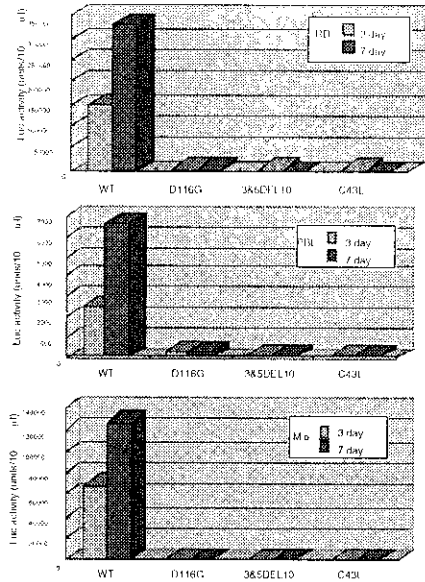


図2. インテグレーション変異体のRD, MDM, Moにおける遺伝子発現

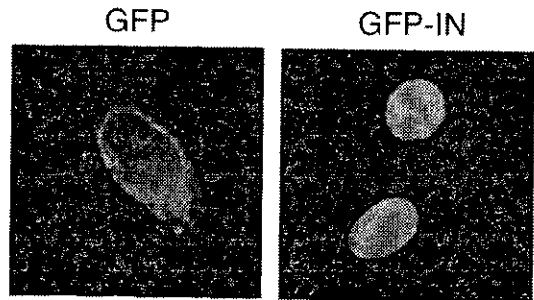


図4. HIV-1 IN蛋白の核局在性

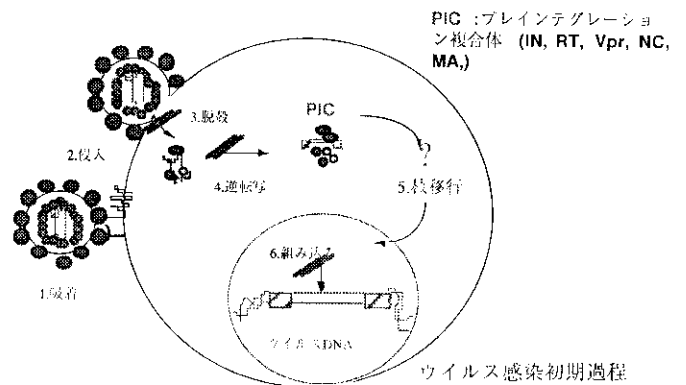


図6まとめ: INはPIC主要構成蛋白であり、感染初期過程のさまざまなステップに作用する。IN変異体は効率よくHIV-1の感染成立を阻止する。



## 15. HIV Gag粒子の形態発生と出芽に関する研究

分担研究者 森川裕子 (北里研究所基礎研ウイルス第2研究室 室長)  
共同研究者 櫻木小百合 (北里研究所基礎研ウイルス第2研究室 研究員)  
後藤俊幸 (大阪医科大学微生物学教室 講師)

### 研究要旨

高等真核細胞では、HIV Gag蛋白は宿主のN-ミリスチル転移酵素 (NMT) によりミリスチル化を受け、形質膜にtargetingしウイルス粒子を形成・出芽する。本研究では、これら一連の過程が途中で停止している酵母と大腸菌を宿主として用い、Gag粒子の形態発生と出芽機構を考察した。Gag蛋白を恒常発現する酵母細胞ではGag蛋白は形質膜にtargetingするものの、粒子出芽はおこらない。しかしながら、この酵母から細胞壁を除去したところ、脂質二重膜に内包されたGagウイルス様粒子が自発的に出芽・放出された。一方、本来NMTを欠く大腸菌に、ヒトNMTを相補しGag蛋白を共発現させたところ、Gag蛋白ミリスチル化が認められた。この大腸菌を電顕で観察したところ、ドーナツ状のVLP様構造物が細胞質膜近傍に局在していた。この共発現大腸菌における粒子の形態発生は、Gag蛋白がpre-assemblyした後targetingするD型レトロウイルスの形態発生と酷似する。

### A、研究目的

高等真核細胞におけるHIV粒子の形態発生は、1) N-ミリスチル転移酵素 (NMT) によるGag蛋白N末端のミリスチル化、2) ミリスチル化に依存した形質膜へのtargeting、3) 形質膜直下でのself-assemblyすなわち多量体形成、4) 出芽による粒子形成、の過程を経る。しかしながら、下等真核細胞である酵母では、NMTによりミリスチル化されたGag蛋白は形質膜へのtargetingするものの、粒子出芽はおこらない(3)の段階で止まる)。さらに、大腸菌では、NMTを欠いているため、Gag蛋白はミリスチル化されず膜へのtargetingはおこらない。本研究では、HIV粒子の形態発生を理解する目的で、Gag蛋白発現の酵母から細胞壁を除去すると粒子出芽がおこるのか、Gag蛋白発現の大腸菌にNMTを共発現させるとGag蛋白は細胞質膜へtargetingするのかを検討した。

### B、研究方法

#### 1、Gag蛋白とNMTの大腸菌内共発現系構築

NMTのcDNAはHeLa細胞cDNAライブラリよりクローニングし、塩基配列を確認して用いた。このNMT cDNAを大腸菌発現ベクターpTrcHisA (ColE1 ori, Amp<sup>R</sup>, Ptrc) に、一方、HIV Gag蛋白 (MA-CA-p2-NCあるいはMA) に相当するcDNA断片を大腸菌発現ベクターpALTER (p15A ori, Tet<sup>R</sup>, Ptac) に挿入した。これらの両ベクターで形質転換した大腸菌にIPTGを添加しinductionを行った。

#### 2、Gag蛋白発現酵母のスフェロプラスト化

Gag蛋白 (full-size, MA-CA-p2-NC, MA-CA-p2) に相当するcDNA断片をYE<sub>p</sub>型ベクター (URA3, P<sub>GAP</sub>) に挿入し、*S. cerevisiae*に導入した。この

Gag蛋白恒常発現の酵母細胞からZymolyaseで細胞壁を除去し、1M Sorbitol添加の等張培地で培養した。

#### 3、Gagウイルス様粒子 (VLP) の精製

細胞壁を除去してGag蛋白恒常発現の酵母の培養液からGag VLPを常法に従って精製した。

#### 4、in vivoラベルとwestern blot

NMTとGag蛋白を共発現する大腸菌にIPTGと [<sup>3</sup>H]myristic acidを同時に添加し、30分培養した。この大腸菌を可溶化後、SDS-PAGEに流し fluorographyを行った。western blotは常法に従って行った。検出には抗HIV-1 CAあるいはMA抗体とNMTのN末端に付加したヒスチジン残基と反応する抗ポリヒスチジン抗体を用いた。

#### 5、電子顕微鏡観察

常法に従って固定し染色後、観察した。

### C、研究結果

#### 1、酵母スフェロプラスト細胞からのGag VLP出芽

full sizeのGag蛋白を恒常発現する酵母から細胞壁を除去し2時間培養した。そのスフェロプラスト細胞を電顕で観察したところ、形質膜からelectron-denseなlayerをもつ複数個の出芽像が認められた。そこで、ウイルス粒子精製の常法に従って、この培養液から粒子を精製したところ、直径100~120nmの球状粒子が確認された。このVLPはauthenticな未成熟型HIV粒子に特徴的なelectron-denseなlayerを有しているものの、そのlayerは開環状であった(図1)。

このVLPが脂質二重膜に内包されているかを明らかにする目的で、0.5% TritonX-100処理とトリプシン消化を行った。Tritonで脂質二重膜を除去

したVLPのGag蛋白はトリプシンで完全分解されたが、Triton未処理のものではGag蛋白は全く消化されなかった(図2)。従って、酵母スフェロプラスト細胞から出芽したVLPは脂質二重膜で完全に内包されていると考えられた。

次に、VLP出芽のkineticsを検討した。細胞壁を除去した酵母を培養し、その培養液中に放出されてくるVLP量を調べたところ、VLP量は継時的に増加するものの、培養1時間で充分量のVLPが産生されることが明らかとなった。

高等真核細胞におけるGag蛋白発現では、C末端～NC領域を削除すると、VLPが形成されないことが既に知られている。そこで、本実験の酵母細胞からのVLP産生においてもこの性状が適用されるか、Gag蛋白truncation体を用いて検討したところ、MA-CA-p2-NCではVLP産生がおこるにも拘わらず、MA-CA-p2ではVLPが産生されなかった。この性状は、高等真核細胞におけるVLP産生の場合と一致する。

以上の結果より、Gag蛋白恒常発現の酵母より細胞壁を除去すると、Gag VLPが脂質二重膜で完全に内包されて自発的に出芽することが明らかとなった。



図1、Gag蛋白恒常発現の酵母スフェロプラスト細胞と精製したGagVLPの電顕観察  
Gag蛋白恒常発現の酵母から細胞壁を除去し培養後、その培養液からGagVLPを精製した。(A)細胞壁除去直後の細胞、(BとC)2時間培養後の細胞、(D)精製GagVLP。

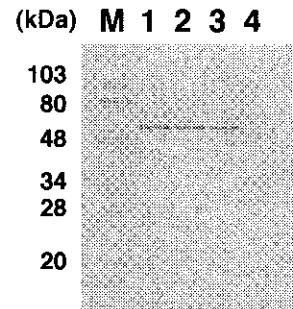


図2、酵母スフェロプラスト細胞培養液から精製したGagVLPのTritonX-100処理とトリプシン消化  
Gag蛋白発現酵母のスフェロプラスト細胞培養液からGagVLPを精製した。そのGagVLPの脂質二重膜を0.5% TritonX-100で除去し、トリプシンで消化した。(A)未処理、(B) TritonX-100処理、(C)トリプシン処理、(D) TritonX-100とトリプシンで処理。

## 2、NMT共発現による大腸菌内Gag蛋白ミリスチル化

構築したGag蛋白とNMTの大腸菌内共発現系で、まず、IPTG inductionによる蛋白発現のkineticsを調べた。抗ポリヒスチジン抗体を用いたwestern boltでN末端にヒスチジン残基を付加したNMTを検出したところ、IPTG induction以前から少量のNMT (53~54kDa) 発現が認められたが、その発現量はIPTG添加により増加していた。一方、Gag蛋白の発現はIPTG添加に完全依存していた。従って、この共発現系では、Gag蛋白発現以前にNMTの発現がおこっていると考えられた(図3)。

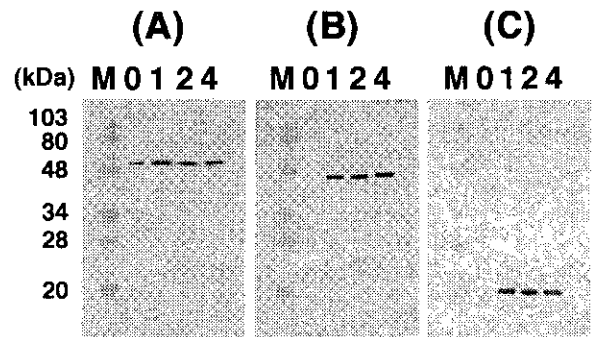


図3、Gag蛋白とNMTの大腸菌内共発現系における蛋白発現kinetics

構築した共発現大腸菌にIPTGを添加し、その発現産物をWestern blotで検出した。(A) MA-CA-p2-NCとNMTを発現する大腸菌lysateをSDS-PAGEに流し、抗ポリヒスチジン抗体で検出したもの、(B) 同サンプルを抗HIV-1 CA抗体で検出したもの、(C) MAとNMTを発現する大腸菌lysateをSDS-PAGEに流し、抗HIV-1 MA抗体で検出したもの。Lane : M; 分子量マーカー、0, 1, 2, 4; IPTG添加後の時間。

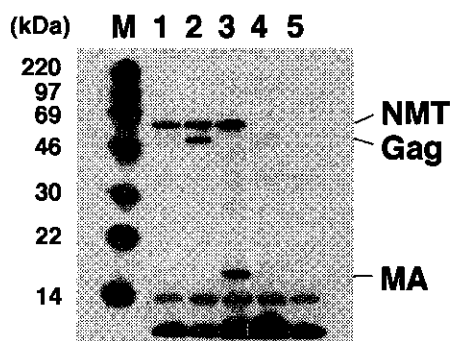


図4、NMT共発現大腸菌におけるミリスチル化Gag蛋白の検出  
構築した共発現大腸菌に $[^3\text{H}]$ ミリスチン酸とIPTGを同時に添加し、30分培養した。その大腸菌lysateをSDS-PAGEに流し、fluorographyを行った。Lane: M;  $[^{14}\text{C}]$ 分子量マーカー、1; NMT単独発現、2; NMTとMA-CA-p2-NCの共発現、3; NMTとMAの共発現、4; MA-CA-p2-NC単独発現、5; MA単独発現。

NMT共発現によるGag蛋白のミリスチル化を $[^3\text{H}]$ myristic acidを用いたin vivoラベルで調べた。NMT単独発現では53~54kDaに、共発現ではこのbandに加え、Gag蛋白 (MA-CA-p2-NCあるいはMA) に $[^3\text{H}]$ の取り込みが認められた。これらGag蛋白ミリスチル化はNMTに完全依存することが確認された (図4)。

NMT共発現によるミリスチル化で、Gag蛋白の大腸菌内局在が変化したかを電顕で観察した。Gag蛋白単独発現では、MA-CA-p2-NCとMA、いずれの場合も、細胞質内にドーナツ状のVLP様構造物が認められた。これは、高等真核細胞において、遺伝子工学的にミリスチル化をできなくしたGag蛋白を発現させた場合と似る。一方、NMT共発現の場合には、これらのドーナツ状のVLP様構造物が大腸菌の細胞質膜近傍に局在した (図5)。

これらの結果から、MA-CA-p2-NCとMAはいずれも、i) 大腸菌細胞質内でドーナツ状のVLP様構造を形成すること、ii) NMT共発現によりミリスチル化されること、iii) ミリスチル化によりそのドーナツ状構造物の局在が細胞質膜近傍に変化することが明らかとなった。

図6に、高等真核細胞・下等真核細胞 (酵母)・大腸菌でのGag粒子の形態発生と本研究結果を図説した。

#### D、考察

本研究では、Gag蛋白恒常発現の酵母からその細胞壁を除去すると、脂質二重膜で完全に内包されたGag VLPが自発的に出芽・放出されることが明らかとなった。これは、下等真核細胞である酵母が高等真核細胞と同様に、Gag VLP形成に必須な宿主因子をすべて備えていることを意味する。

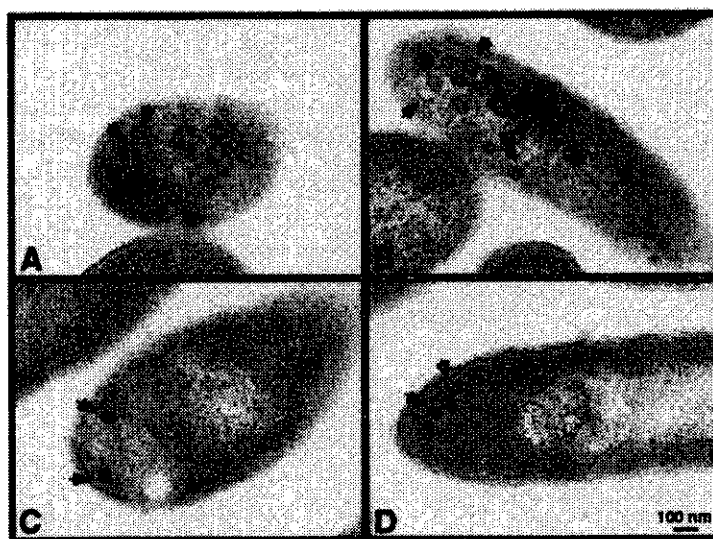


図5、Gag蛋白単独発現とNMT共発現大腸菌の電顕観察  
構築した共発現大腸菌にミリスチン酸とIPTGを同時に添加し、3時間培養した。その大腸菌を薄切電顕で観察した。(A) MA-CA-p2-NC単独発現、(B) MA単独発現、(C) MA-CA-p2-NCとNMTの共発現、(D) MAとNMTの共発現。

これに対し、NMTとGag蛋白の大腸菌内共発現系、すなわち、NMTを相補した大腸菌におけるGag粒子の形態発生は、細胞壁をもつ酵母での形態発生を擬態しなかった。この大腸菌では、C型レトロウイルス粒子の形態発生経路（形質膜targeting → assembly）を取らず、むしろD型レトロウイルス粒子の形態発生経路（assembly → 形質膜targeting）を経て、VLP様粒子が形成されているように思われる。この結果は、真核細胞でのGag VLP形成には、原核細胞では存在しない宿主因子（例えば、細胞骨格蛋白など）が関与する可能性を示唆している。

近年、様々なGag蛋白断片の大腸菌内assembly構造物が観察されている。CAやCA-p2-NCを発現させた場合にはもっぱらシリンダー状の構造物が認められるが、これらのN末端にMA領域（の一部）を付加するとそのassembly構造物が球状に変化する。本研究では、MA領域のみの発現で球状構造物が観察された。これはGag蛋白assemblyによる球状粒子形成がMA領域のassembly形状に規定されることを示唆している。

#### E、結論

Gag蛋白恒常発現の酵母からその細胞壁を除去すると、脂質二重膜で完全に内包されたGag VLPが自発的に出芽・放出された。また、本来NMTを欠く大腸菌にNMTを相補しGag蛋白を共発現させたところ、ミリストイル化Gag蛋白はpre-assembly phenotypeを示して、細胞質膜近傍に局在を変化させた。

#### F、研究発表

##### 1、論文発表

- 1) Yuko Morikawa, Toshiyuki Goto, and Kouichi Sano  
In vitro assembly of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein  
J. Biol. Chem. 274: 27997-28002 (1999)
- 2) Shigeyoshi Harada, Eiji Haneda, Toshiro Maekawa, Yuko Morikawa, Shinji Funayama, and Kenzo Ohtsuki  
CK-II-mediated stimulation of HIV-1 RT activity and characterization of its selective inhibitors in vitro  
Biol. Pharm. Bull. 22: 1122-1126 (1999)
- 3) Yuko Morikawa, David J. Hockley, Milan V. Nermut, and Ian M. Jones  
Roles of matrix, p2, and N-terminal myristoylation in human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly  
J. Virol. 74: 16-23 (2000)
- 4) 森川裕子、櫻木小百合  
HIV粒子アッセムブリー

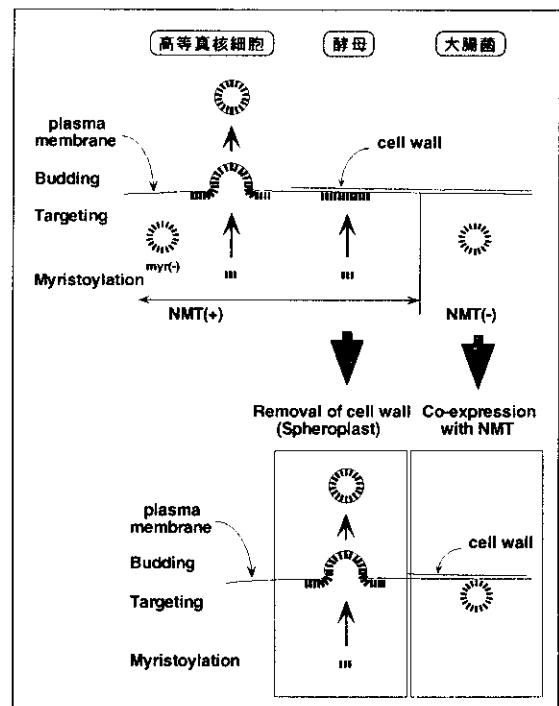


図6、高等真核細胞・酵母・大腸菌におけるGag粒子形態発生の比較

医学のあゆみ 189: 997-1001 (1998)

#### 2、学会発表

- 1) Yuko Morikawa, Toshiyuko Goto, and Kouichi Sano  
In vitro assembly of human immunodeficiency virus Gag protein  
XIth International Congress of Virology, 1999/8/8-13, Sydney, Australia
- 2) 羽田英司、原田恵嘉、森川裕子、大槻健蔵  
Casein kinase II (CK-II) によるHIV-1 RTの活性化に関する解析  
第72回日本生化学会大会、1999/10/6-9、横浜  
森川裕子、後藤俊幸、佐野浩一
- 3) ヒト免疫不全ウイルス Gag 蛋白による試験管内粒子形成  
第47回日本ウイルス学会総会、1999/11/7-9、横浜