

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV 感染前期過程の解析に関する研究

分担研究者 小柳義夫 東北大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

本研究では HIV 増殖の前期過程におけるウイルス DNA の合成と変換のメカニズムを正確に理解するために、それぞれの型の細胞内ウイルス DNA を測定するアッセイを確立した。それは細胞内に侵入したウイルス RNA から DNA への逆転写反応、核内移行、そして、染色体へのインテグレーションまでのウイルス DNA を PCR 法により正確に定量できるアッセイである。その結果、以下のことがわかった。1) strong-stop DNA 合成は S 期において活発である。2) 核内移行は細胞周期に依存しない。3) Full-length DNA 合成とインテグレーションには感染後 6 時間を要する。4) 末梢血単核球においては、細胞株に比べ侵入効率が 100 倍以上劣るが、活性化した細胞においては感染して 48 時間後にはウイルス DNA の 35% はインテグレーションしている。5) 活性化されていない末梢血単核球ではインテグレーション効率はさほど阻害さず、ウイルス DNA の 21% はインテグレーションしていた。以上の結果から HIV の増殖過程において strong-stop DNA 合成は細胞周期に依存するが、他はさほど影響を受けず、特にインテグレーションは細胞が休止期にあっても、十分に起こりうるということがわかった。このアッセイから、HIV 前期過程の実体の理解ができるようになった。

A. 研究目的

エイズ発症抑制のため、HIV 増殖の分子メカニズムを解明する。本研究はこのウイルスの増殖の前期過程に焦点を絞る。その理由はこの過程においては、ウイルス遺伝子数は細胞あたり少なく、制御可能と考えるからである。そして、薬剤開発ならびに遺伝子治療のための基礎的知見を得る。さらに、新しい定量法を確立し、その技術を臨床的に応用し、HIV 感染者体内におけるウイルス遺伝子評価としての意義を検討する。

B. 研究方法

細胞：HTLV 陽性 CD4 陽性細胞株である MT-4 細胞と正常人末梢血由来の単核球 (PBMC) を使った。PBMC は分離後、 $1 \mu\text{g/ml}$ の PHA を添加し、活性化あるいは、そのまま、ヒト血清にて培養し非活性状態を維持した。

ウイルス：*nef* 領域に luciferase 遺伝子を挿入し *env* 領域を欠いた HIV-luc ベクターを用いた (J. Virol. **69**:6687-6696, 1995)。

ウイルスの作出はこのベクター DNA とウイルス水疱性口内炎ウイルスの G 蛋白質 (VSV-G) を発現するプラスミドとを 293T 細胞に Ca 法にてトランスフェクトし、3 日目に培養上清を回収し、ウイルス液とした。ウイルス変異体として、インテグレース変異ウイルス (D116G)、Vpr 欠損ウイルス (Δ Vpr)、PBS 欠損ウイルス (Δ PBS) を用いた。ウイルス感染に先立ち、DNAase にてウイルス液中の DNA を除き、gag p24 量として 100ng のウイルスを細胞に 2 時間感染させ、洗浄後、培養した。

リアルタイム PCR：HIV 特異的プライマーペアを図 1 のようにデザインし、R/U5 DNA 量, U5/gag DNA 量, 2LTR DNA 量を ABI PRISM 7700 (PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif.) にて定量した。インテグレーション量の定量には Chun らにより報告されたプライマーを用いた (Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:13193-13197, 1997.)。インテグレーションされた HIV DNA の定量的ためのスタ

ンダードは MT-4 細胞に HIV ベクター(J. Virol. 72:8150-8157, 1998)を導入して作製した細胞 (MT-4 CS/CG) を確立した。

細胞周期：MT-4 細胞に 1 mM hydroxyurea を 15 時間処理後、10 時間薬剤を除き、さらに 10 時間薬剤の処理を行ない、細胞周期を同調させた。その後の細胞内 DNA 量を propidium iodide にて染色し、FACS にて細胞周期を測定した。

倫理面への配慮：PBMC の採取にあたり、供血者から実験への同意を得、さらに、検体の個人情報の守秘管理は徹底した。なお、本検体の HIV 以外の遺伝子解析は行っていない。

C. 研究結果

インテグレーション DNA の測定法の確立：まず、インテグレーション DNA を特異的に増幅するプライマーの設定を行なった。5 プライムのプライマーはヒト染色体に多数存在する Alu 配列、3 プライムのプライマーは HIV の gag 領域に結合するものである。これらのプライマーを用いて、まず、長い DNA を増幅できる long PCR を行ない、5 プライムに隣接する染色体配列を含んだ HIV 配列をまず、増幅し、次に、100, 1,000, 10,000 倍に希釈し、それぞれのサンプルを HIV R/U5 特異的プライマーにてその HIV DNA 量を測定しようと考えた。そこで、まず試料中の HIV インテグレーション DNA の定量を行なうには、スタンダードとなる HIV の感染細胞が必要である。実際のサンプルにおいてはインテグレーションされた DNA は、はじめの long PCR において増幅される Alu 配列からの DNA の長さは様々であり、スタンダードとなる DNA もランダムにインテグレーションされた染色体 DNA を有していることが必要である。そこで、シングルラウンドの HIV ベクターを VSV G 蛋白質を用いた pseudotype ウイルス にて MT-4 細胞に導入して作製した細胞 (MT-4 CS/CG) を確立した。この細胞はベクターに導入されている GFP 蛋白質を感染後 7 週目には 80%以上発現し、インテグレーション部位はランダムであることを確認した。また、R/U5 と U5/gag DNA 量はいずれも 100 ng DNA あたり $7,474 \pm 715$ コピーと変動しないこと、さらに、ウイルスが増殖

している時に出現する 2 LTR DNA は検出感度以下であることより、この細胞中の HIV DNA はすべてインテグレーションされた DNA のみで、その遺伝子数は上述のコピー数であると結論つけた。すなわち、HIV がランダムにインテグレーションされたスタンダード DNA を作出した。

このスタンダード DNA を用いて、上述の PCR を行ない、その定量性を検討した。はじめの long PCR 反応に入れるスタンダード DNA 量を 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 ng とそれぞれ設定し、さらに増幅後の PCR 産物を 100, 1,000, 10,000 倍に希釈し、HIV R/U5 特異的プライマーによるリアルタイム PCR により測定した。図 2 のようにリアルタイム PCR における C_T 値 (PCR 反応においてははじめのポリメラーゼ反応が起こるサイクル数) とスタンダード DNA 量には 100, 1,000, 10,000 倍いずれの希釈系列においても逆相関がみられ、スタンダードカーブが引けることがわかった。しかし、はじめの long PCR 反応の陰性コントロール (PCR 反応に酵素を入れずに行なう) のなかで 100, 1,000 倍に希釈したサンプルで 10ng 以上のスタンダード DNA を入れると HIV DNA が検出されている。これは、さらに 10,000 倍に希釈したサンプルでは検出されておらず、実際の試料を定量化するためのスタンダードとするには多段階の希釈が必要であるとわかった。そして、このスタンダード DNA を使って、インテグレーション DNA が細胞あたり 1 コピーとわかっている ACH2 細胞を用いてこのアッセイを行なってみると、スタンダード DNA と同じ直線性が予想したとおり得られた (図 2 下段)。

HIV 増殖前期過程におけるウイルス DNA の定量法：上述のようにインテグレーション DNA 測定法が確立された。そして、2LTR DNA 量の測定法はすでに確立されている (Nature Med. 6:76-81, 2000) ので、これらの DNA が形成される前に合成される strong-stop DNA, full-length DNA などの前駆体ウイルス DNA 量を算出できる。それは strong-stop DNA 量は R/U5 DNA 量から U5/gag 量を引いて、full-length DNA と 1LTR DNA 合計量は U5/gag 量からインテグレーション DNA 量と 2LTR DNA 量をそれぞれ引いて算出される。表 1 は MT-4 細胞に HIV-luc

ウイルスを感染させ 48 時間後のそれぞれのウイルス DNA 量を示している。この HIV-luc ウイルスはシングルラウンドの感染系であり、他の細胞への感染が広がらないため、感染後のそれぞれのウイルス DNA 量を正確に表している。その結果、感染後 48 時間のあいだにはウイルス DNA (R/U5 primer にて測定される) の 78% はインテグレーションしていることがわかった。

さらに、この定量法を確認するために、インテグレース変異ウイルス (D116G)、Vpr 欠損ウイルス (Δ Vpr)、PBS 欠損ウイルス (Δ PBS) を用いて同様の実験を行なってみた (図 3)。予想のようにインテグレース活性がない D116G ウイルス感染細胞ではインテグレーションはほとんど見られず、他のウイルス DNA が増えていた。細胞周期阻害作用がない Δ Vpr ウイルス感染細胞では、野生株のウイルスとの違いはほとんど見出されなかった。逆転写反応のとき tRNA プライマーが結合する部位を欠いている Δ PBS ウイルスは strong-stop DNA 合成が阻害されているので、その後の DNA はほとんど検出されなかった。すなわち、これらの変異体ウイルスを使って、この前期過程の DNA 変換を測定するアッセイ法の特異性が確認された。

細胞周期とウイルス DNA 合成効率の検討：前期過程における逆転写反応によるウイルス DNA 合成と核内移行とインテグレーションというウイルス DNA の変換過程を把握するとともに、細胞周期がどのような影響を及ぼすか検討した。細胞周期を DNA ポリメラーゼの阻害剤である hydroxyurea にて処理するとこの阻害剤を除去後 24 時間は $67.2 \pm 9.7\%$ の細胞が同調して増殖することがわかった。図 4 A のヒストグラムはこの同調させた細胞にウイルスを感染後 24 時間の細胞 DNA 量の変動を示している。図 4 B の上段はこれをグラフ化したものである。そして、図 4 B の中段は strong-stop DNA と full-length DNA と 1LTR DNA、下段は 2LTR DNA とインテグレーションした DNA の感染後の出現量を示している。また、細胞周期の違いによる影響を見るために、同調させていない培養条件におけるウイルス DNA の変動も検討した (図 4 C)。その結果、以下の点が明らかになった。1)

HIV 侵入後の逆転写反応では strong-stop DNA 合成は S 期において活発である。2) 2LTR DNA の形成 (核内移行) とインテグレーションはほとんど細胞周期に左右されない。3) Full-length DNA 合成とインテグレーションには感染後 6 時間を要する。

末梢血単核球細胞におけるウイルス DNA の合成と変換効率：同様のアッセイ法を PBMC へ同じウイルスを感染させた細胞を用いて行なった。細胞の活性化による変化を検討するために PHA を添加し活性化した培養系と非活性化状態を維持した培養系における逆転写反応によるウイルス DNA の合成とインテグレーションへの変換効率を検討した。図 5 A はそれぞれの培養系の細胞周期の変動を示している。非活性化 (unstimulated) PBMC ではほとんどの細胞が G1 期に止まっていることがわかる。図 5 B は活性化細胞が非活性化細胞に比べ、すべての型のウイルス DNA 量が多いことを示している。細胞株に比べ侵入効率が 100 倍以上劣るが、活性化した細胞においては感染して 48 時間後にはウイルス DNA の 35% はインテグレーションしている。一方、非活性 PBMC 内における逆転写反応は、Full-length DNA までの合成効率が活性化された細胞に比し劣るが、感染して 48 時間後にはウイルス DNA の 21% はインテグレーションしている。すなわち、インテグレーション効率はさほど阻害されない。図 5 C はその細胞内における luciferase 蛋白質の発現量を示しているが、明らかに活性化細胞内における発現効率が優れていることがわかる。非活性化細胞内のそれはほとんど陰性であった。

D. 考察

本実験の結果、はじめてウイルス前期過程におけるウイルス DNA の合成と変換効率、特にインテグレーションの量的把握ができるようになった。

これらの結果は、ウイルス DNA の核内移行からインテグレーションまでの過程では、細胞周期に左右されないメカニズムがあることを示唆している。これまで、種々の解析からウイルス増殖のメカニズムについて多くの新しい知見が得られてきたが、いまだ完全ではない。侵入過程はコレセプターの発見から、逆転写の過程はその酵素

の結晶構造解析と阻害剤の開発から、分子機構はかなり明らかになってきている。しかし、それ以降の核内移行からインテグレーションの過程について、実際のウイルス感染細胞内における解明は遅れている。細胞内における定量的把握はほとんどなされていなかった。また、この方法の確立より、実際の感染者、特に HAART 療法中のエイズ患者の染色体にインテグレーションしたウイルス DNA 量が把握できるようになり、予後や治療方法への指標など検討すべきことは多い。

特にウイルス DNA の核内移行ならびにインテグレーションが把握できるようになった。その過程においては preintegration complex(PIC)といわれるウイルス DNA とインテグラーゼ、マトリックス、VPR などのウイルス蛋白質と HMG I(Y)蛋白質などの細胞蛋白質からなる複合体が、その機能を担っていることが報告されている。この PIC の機能を阻害する方法が見出され、生体内のウイルス増殖を阻害すること、すなわち、エイズ発症の阻止の方法を見出すことが最終目標である。

E. 結語

ウイルス RNA から DNA への逆転写反応、核内移行、そして、染色体へのインテグレーションまでのウイルス増殖前期過程のウイルス DNA を正確に量的に把握できることができるようになった。

F. 健康危険情報

エイズ発症阻止に向けて学問的進歩が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Takahashi K, Baba S, Chattopadhyay P, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G. Structural requirement for the two-step dimerization of human immunodeficiency virus type-1 genome. *RNA* 6: 96-102, 2000.
- ② Momoi Y, Ichiyama K, Chowdhury IH, Koyanagi Y, Yamamoto N. Pertussis toxin enhances human immunodeficiency virus-1 replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16: 373-379, 2000.
- ③ Tsunetsugu-Yokota Y, Kato T, Yasuda

S, Matsuda Z, Suzuki Y, Koyanagi Y, Yamamoto N, Akagawa K, Cho M, Takemori T. Transcriptional regulation of HIV-1 LTR during antigen-dependent activation of primary T-cell by dendritic cells. *J. Leu. Bio.* 67: 432-440, 2000.

④ Takahashi K, Baba S, Hayashi Y, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G. NMR analysis of intra- and inter-molecular stems in the dimerization initiation site of the HIV-1 genome. *J. Biochem.* 127: 681-686, 2000.

⑤ Kusagawa, S., Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Ishikawa K, Sata T, Nagai Y, Tatsumi M. Isolation and characterization of full-length molecular DNA clones of Ghanaian HIV-1 intersubtype A/G recombinant (CRF02_AG) which is replication-competent in restricted host-range. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press.

⑥ Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. Critical contribution of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4⁺ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice *J. Exp. Med.* in press.

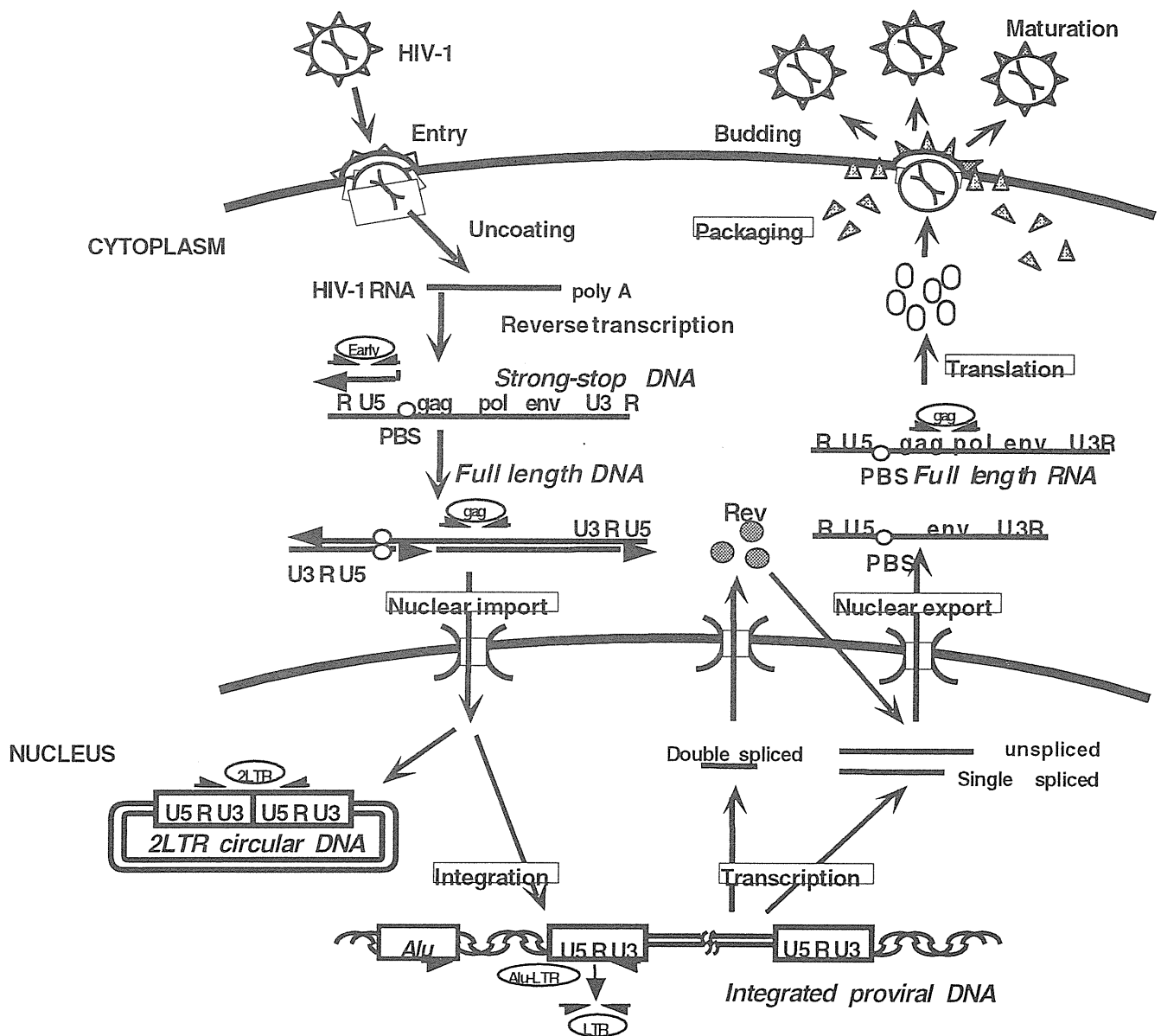
2. 学会発表

- ① Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. CD4 killing in HIV-1 infected spleen of hu-PBL NDO-SCID mouse through bystander cell. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor, 2000.
- ② Suzuki Y, Sato C, Yamamoto N, Koyanagi Y. Measurement of HIV-1 DNA in cytoplasm and nucleus. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor, 2000.
- ③ 三浦義治、三沢尚子、水澤英洋、山本直

樹、小柳義夫. HIV-1 感染リンパ組織内の bystander cell による TRAIL 依存性 T 細胞の破壊. 第 48 回日本ウイルス学会、津、2000

- ④ Miura Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. TRAIL is a major signal of CD4+ T cell killing in HIV-1 infected hu-PBL NDO-SCID mice through bystander cell. 第 30 回日本免疫学会、仙台、2000.
 - ⑤ 高橋良明、田中勇悦、山下篤哉、小柳義夫、中村正孝、山本直樹. TNF レセプターファミリー分子 OX40 の gp34 による刺激は HIV-1 感染培養 T 細胞のウイルス産生を強力に促進させる. 第 30 回日本免疫学会、仙台、2000.
 - ⑥ 武内寛明、鈴木陽一、蝦名博貴、小柳義夫. PCR による感染性 HIV-DNA の構築とその問題点. 第 14 回日本エイズ学会、京都、2000.
 - ⑦ 高橋良明、田中勇悦、山下篤哉、小柳義夫、山本直樹. HIV-1 潜伏感染 T 細胞株の OX40 を介した刺激によるウイルス産生と細胞死の誘導. 第 14 回日本エイズ学会、京都、2000.
 - ⑧ Miura Y, Koyanagi Y. Critical contribution of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of CD4+ T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice The Development of Antiviral Therapies. "The Development of Antiviral Therapies" Palm Spring, 2001.
- G. 知的所有権の出願、登録状況
- 1. 特許取得 なし
 - 2. 実用新案登録 なし
 - 3. その他 なし

Fig. 1A. Primer sets for detection of HIV-1 replication cycle



Quantitative Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Dynamics from Reverse Transcription to Integration in Infected Cells

FIG 1 (Suzuki et al.)

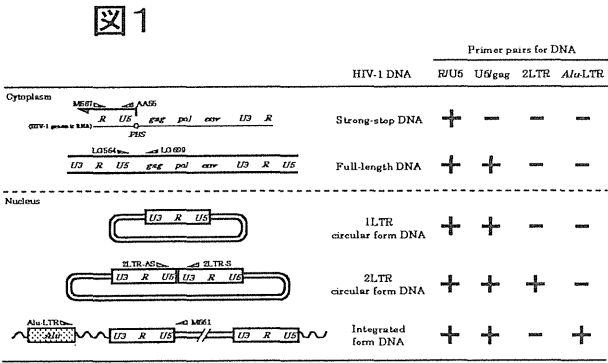


Fig. 1. Reactivity of oligonucleotide primers used for the real-time PCR assay. HIV-1 DNA (thick lines) is synthesized from the genomic RNA template (thin line) in the cytoplasm. Reverse transcription is initiated using tRNA as a primer, which is based-paired at the PBS (open circle). A short minus-stranded viral DNA is copied from the PBS of the genomic RNA up to the 5' cap (strong-stop DNA). Synthesis of double-stranded viral DNA (full-length DNA) is completed after the first and second template switches. The full-length viral DNA enters the nucleus, where it is integrated into the host genome or forms unintegrated circular DNA (1LTR or 2LTR circular form DNA). The following computations were used to determine the amounts of the individual forms of DNA. The number of strong-stop DNA copies = R/U5 DNA copies - U5/gag DNA copies. The copy number of unintegrated (linear) full-length and 1LTR circular form DNA = U5/gag DNA copies - 2LTR circular form DNA copies - integrated form DNA copies.

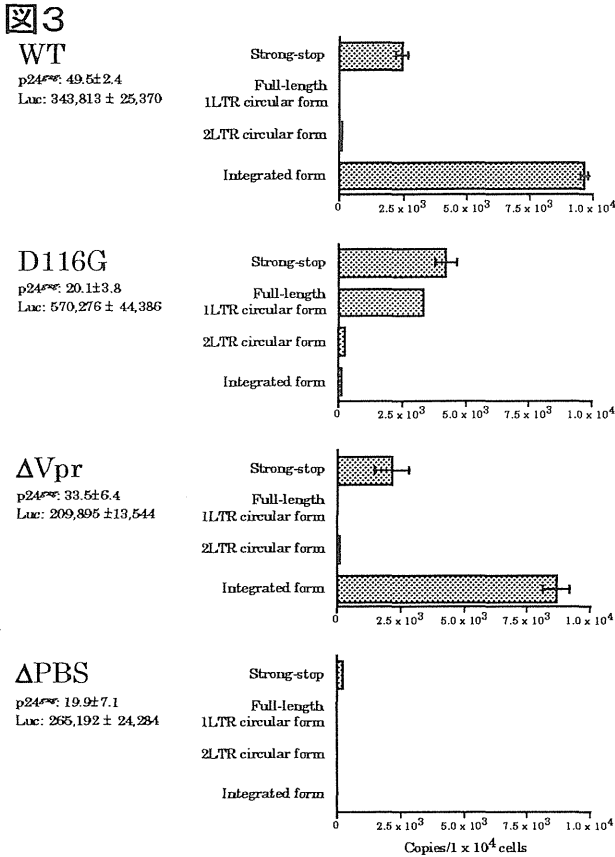


FIG 2

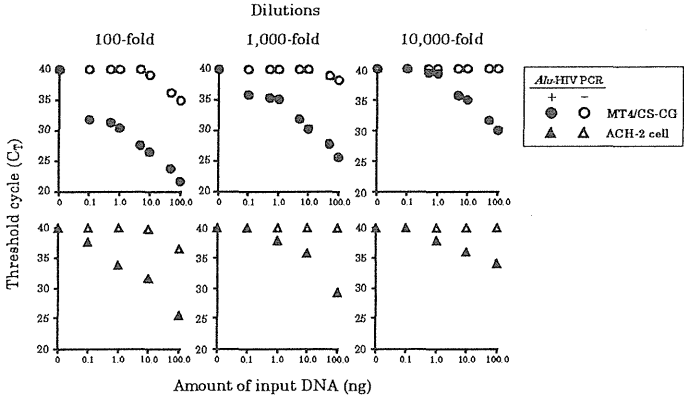


Fig. 2. Standard curves for the amount of integrated DNA amplified by PCR. The total DNA was extracted from MT4/CS-CG (top panels) and ACH-2 (bottom panels) cells and 0.1 - 100 ng genomic DNA was amplified in the first PCR using *Afu*- and HIV-1-specific antisense primers. As a negative control, the same amount of DNA was subjected to the first PCR without rTth DNA Polymerase (PE-Applied Biosystems). Next, the products from the first PCR diluted 100-, 1,000-, or 10,000-fold (closed symbols) and the negative control (open symbols) were subjected to real-time PCR using sense primer M667, antisense primer AA55, and fluorogenic probe HIV-FAM. The threshold cycle obtained in the real-time PCR (C_T) was plotted against the amount of input DNA subjected to the first PCR. The data are from three independent experiments and all SD are below 1.0 (data not shown).

Fig. 3. Measurement of the individual forms of HIV-1 DNA in WT- or mutant virus-infected cells. (A) The number of viral DNA copies per 1 x 10⁴ cells is indicated (mean ± SD). The total DNA was extracted from MT-4 cells 48 h after infection, and 100 ng of DNA was subjected to the R/U5, U5/gag, 2LTR, and *Afu*/LTR PCR assays. To prepare each pseudotype virus, 293T cells were cotransfected with luciferase-expressing HIV-1 vector DNA and VSV-G-expressing DNA. The amount of HIV-1 p24^{gag} in the culture supernatant (ng/ml) from transfected cells and the luciferase activity (Luc, relative light units/μg protein) in the cells (3 days) are indicated as means ± SD. Results are from triplicate experiments.

Fig. 4

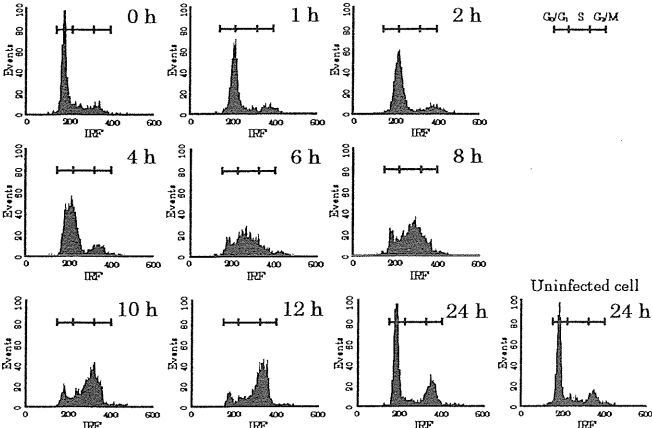


FIG. 4B (Suzuki *et al.*)

B. Synchronized cells

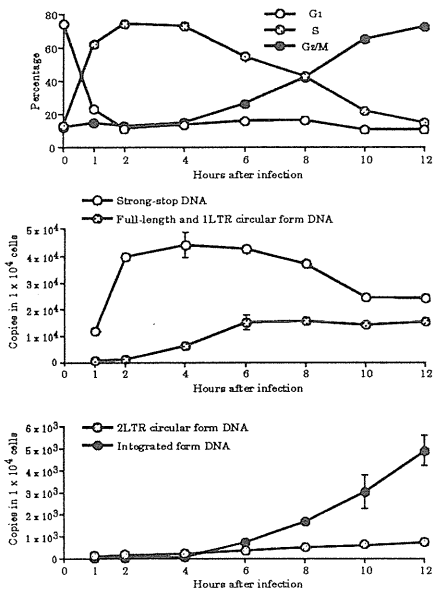


Fig. 4. Kinetics of HIV-1 DNA synthesis and integration in relation to cell-cycle progression. The progression of the cell cycle was blocked with two treatments of 1 mM hydroxyurea (HU). Synchronized cells were obtained by removing the HU, then the cells were infected with VSV-G pseudotyped WT virus. Cells were harvested at 1, 2, 4, 6, 8, 10, and 12 h after infection and the total DNA was extracted. One hundred nanograms of DNA was subjected to the assay. (A) Cell-cycle analysis of infected (0 to 24 h) and uninfected (24 h) cells. The cells were collected at each time point, washed, fixed with 70% ethanol, and stained with propidium iodide followed by flow cytometer analysis. Integral red fluorescence (IRF) indicates the DNA content in the cell. (B) Transition of viral DNA in synchronized culture. The top panel indicates data from (A) plotted as the percent of G₁, S, or G₂/M phase cells in the WT-infected culture over time. The numbers of viral DNA copies in the strong-stop and full-length/1LTR circular form over the same time period are indicated in middle panel and those in the 2LTR circular and integrated forms are indicated in the bottom panel. The data are means $\pm$ SD (error bars) from three infection experiments. (C) Transition of viral DNA in unsynchronized culture. The numbers of DNA copies in the strong-stop and full-length/1LTR circular forms are indicated in the top panel and those in the 2LTR circular and integrated forms are indicated in the bottom panel. Data are means $\pm$ SD (error bars) from three independent experiments.

C. Unsynchronized cells

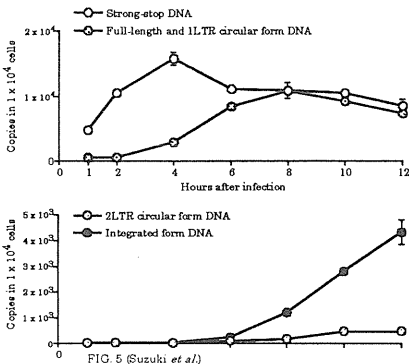


FIG. 5 (Suzuki *et al.*)

Fig. 5

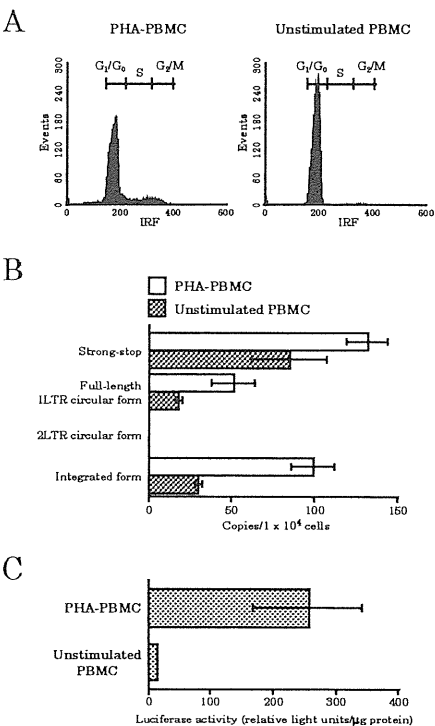


Fig. 5. Reverse transcription and integration efficiency in stimulated and unstimulated PBMC culture. (A) Cell-cycle analysis of infected cells. The cells were harvested 48 h after infection and subjected to cell-cycle analysis as described in Fig. 4. (B) Measurement of the individual forms of HIV-1 DNA. After 48 h of infection the DNA was extracted and subjected to the real-time PCR assays. The copy number of the individual forms of HIV-1-specific DNA per 1×10^4 cells is indicated. (C) Luciferase activity in infected cells. A luciferase assay was performed. The luciferase activities are shown as relative light units per microgram protein. Results are means $\pm$ SD (error bars) from three independent experiments with two different blood donors.

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

Vpr 測定法の確立と Vpr を標的とした抗 HIV 薬の開発に関する研究
分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部長

研究要旨 HIV アクセサリー遺伝子である Vpr が細胞周期異常を誘発することにより HIV 産生を促進する可能性を示すと共に、Vpr を標的とした新しい抗エイズ薬開発に向けたアッセイ法の確立を試みた。Vpr は細胞周期制御因子であるサイクリン B やセクリンに結合すること、そしてこの結合がそれぞれの蛋白質発現調節において重要な役割を担う Destruction box（以下 D-box）を介していることを明らかにした。一方、Vpr に結合するペプチド（VAP-1；Vpr associating peptide）を同定し、VAP-1 が Vpr によって誘導される細胞周期異常を抑制することを見い出した。そして、Vpr 蛋白質と VAP-1 を用いた固相法によるアッセイ系を確立し、現在までに 240 種類の海洋生物由来抽出物の内、5 種に結合阻害活性を見い出した。

A. 研究目的

患者血清中に存在し、細胞周期異常と潜伏感染細胞からのウイルス産生を誘導することが知られている Vpr に着目し、Vpr の検出系と本遺伝子産物を標的とした新しい抗 HIV 因子の探索を目指す。特に本年度は、抗 Vpr 因子探索に向けたアッセイシステムの構築を試みた。

B. 研究方法

Vpr 発現細胞である MIT-23 にさらに HIV-LTR/EGFP プラスミドを導入し、HLEG-29 を樹立した。これに Vpr を発現させることにより生じる EGFP の発現と細胞中の DNA 量の関連を FACS で解析した。一方、ランダムペプチドライブラリーから Vpr に結合するペプチド（VAP-1）を明らかにした。VAP-1 と Vpr の結合のモニタリングシステムを 96 穴 ELISA プレートを用いて確立した。即ち、Vpr をまずプレートに吸着させ、その後ビオチン化 VAP-1 を加える。さらにストレプトアビジン-HRP で発色した。リコンビナントセクリン及びサイクリン B 由来のペプチドと Vpr を反応させた後、抗 Vpr 抗体を用いた免疫沈降法にて、2 者の直接的な結合を検定した。

C. 研究成果

Vpr による細胞周期異常が HIV-LTR 転写促進の必要条件になっていること、Vpr が細胞周期の制御因子として知られるサイクリン B に結合すること、ランダムペプチドライブラリーから Vpr に結合するペプチド（VAP-1；Vpr associating peptide）を同定する一方、VAP-1 が Vpr 誘発細胞周期異常を抑制すること、Vpr の発現により細胞分裂期でのサイクリン B の蛋白質分解が著明に遅延することを明らかにした。以上の知見を基に、リコンビナント Vpr とビオチン化 VAP-1 との結合能検出系を構築し、さらにこのシステムを用い

て、240 種の海洋生物抽出物から、Vpr と VAP-1 の結合を阻害する検体を 5 検体同定した。

D. 考察

Vpr により HIV-LTR 転写活性が誘導されることが報告されているが、本研究により、Vpr により誘発される細胞周期異常との密接な関連が示された。このことは、Vpr により誘導される細胞周期異常の分子機構を明らかにし、これを阻害する因子の同定が新規抗 HIV 薬開発の可能性を明らかにする上で、究めて重要であることを示唆する。今回、確立した Vpr と VAP-1 ペプチド結合アッセイ系は、上記目的を達成するための重要な実験系になり得ると考えられる。

E. 結論

1. Vpr により誘導される HIV 転写活性誘導は、細胞周期異常により生じる DNA 量増加に比例しており、細胞周期異常が HIV 産生誘導の分子基盤になっていることが示唆された。
2. サイクリン B に Vpr が結合することを示した。また Vpr 発現細胞においてサイクリン B の発現が増強していることを見い出した。サイクリン B の発現調節異常が M 期の遅延及び HIV 産生誘導の原因になっている可能性が考えられる。
3. Vpr 結合ペプチド（VAP-1）添加により Vpr 誘発細胞周期が抑制されることを明らかにした。
4. Vpr 機能を抑制することが期待される化合物の候補が得られた。今後、阻害因子の候補について培養細胞を用いた検定を行い、精製後構造決定を予定している。

F. 健康危険情報 無

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimura, M. and Ishizaka, Y. Inhibition by quercetin of micronuclei formation via Vpr, an accessory gene of HIV. Recent Research Developments in Cancer. In press.
 2. Terui, Y., Mori, M., Tomizuka, H., Takizawa, T., Miyazato, A., Uwai, M., Mishima, Y., Ueda, M., Inoue, R., Yamada, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Kato, T., Ozawa, K., and Hatake, K. A new human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of calmodulin-dependent kinase IV. J Cell Phys., in press.
 3. Uwai M, Terui Y, Mishima Y, Tomizuka H, Ikeda M, Itoh T, Mori M, Ueda M, Inoue, R., Yamada, M., Hayasawa, H., Horiuchi, T., Niho, Y., Matsumoto, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Ozawa, K., and Hatake, K. A new apoptotic pathway for complement factor B derived fragment Bb. J Cell Physiol., 185 , 280-292, 2000.
 4. Shimura, M., Okuma, E., Yuo, A., Hatake, K., Takaku, F., Ishizaka, Y. Oxidative stress involved in room temperature induced apoptosis of HL-60 cells. J. Leukoc. Biol. **68**, 87-96, 2000.
 5. Yano, R., Shimura, M., Taniguchi, M., Hayashi, Y., Suzuki, T., Hatake, K., Takaku, F., and Ishizaka, Y. Selective gene transfer to neuroblastoma cells by a monoclonal antibody targeting RET, a receptor tyrosine kinase. Human Gene Therapy, **11**, 995-1004, 2000.
 6. Okuma, E., Saeki, K., Shimura, M., Ishizaka, Y., Yasugi, E., and Yuo, A. Induction of apoptosis in human hematopoietic U937 cells by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: possible existence of caspase-3 like pathway. Leukemia, **14**, 612-619, 2000.
2. 学会発表
- Shimura, M. and Ishizaka, Y. Genomic instability by Vpr, an accessory gene of immunodeficiency virus; implication as a causative factor of AIDS-related tumors. 5th World Congress on Advances in Oncology. October 19-21, Greece.
- 志村まり、石坂幸人. HIV アクセサリー遺伝子 VPR の細胞間トランス作用. 第 23 回日本分子生物学会年会. 2000 年 12 月 13-16 日、神戸
- 小谷秀示、田中弘文、志村まり、安田秀世、石坂幸人. HIV-1/Vpr による M 期特異的阻害機構と染色体不安定性の検討. 第 23 回日本分子生物学会年会. 2000 年 12 月 13-16 日、神戸
- H. 知的財産権の出願登録状況（予定を含む。）
1. 特許取得、出願準備中
Vpr 結合蛋白質の同定と抗 Vpr 因子探索のための固相法開発
 2. 実用新案登録、無
 3. その他、無

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

ウイルス感染に伴う宿主遺伝子発現の変化

分担研究者 渡辺 慎哉 東京大学医科学研究所癌遺伝形質分野助手

研究要旨

HIV 及び日和見感染の病原体と宿主細胞の相互作用を明らかにしてエイズ発症機構の解明につなげるため、合成 DNA マイクロアレイによる宿主遺伝子発現解析系を平成 12 年度内に確立した。

A. 研究目的

HIV 及び日和見感染の病原体と宿主細胞の相互作用を明らかにしてエイズ発症機構の解明につなげるため、合成 DNA マイクロアレイによる宿主遺伝子発現解析系を平成 12 年度内に確立する。

B. 研究方法

1. 合成 DNA を結合させるために各種の表面処理を施したスライドガラスを収集し、その結合効率を比較検討した。
2. 合成 DNA を結合させるための至適条件を検討・開発した。
3. 合成 DNA の長さを変化させ、最も効率よくスライドガラスに結合する長さ、および最も強いハイブリダイゼーションシグナルを与える長さを検討した。
4. 逆転写酵素反応において、蛍光色素 Cy5 および Cy3 を結合させた dUTP がもっとも効率よく cDNA 中にとりこまれるための至適条件を

検討した。

5. 先端にスリットを有する金属針を用いて微量の合成 DNA 溶液を分注する機械および作動プログラムをメーカーの技術者とともに開発・改良した。
6. 均一に微量の合成 DNA 溶液をスライゴガラス上に分注するために必要なツールを検討・開発した。
7. 合成 DNA 溶液をスポットした後のスライドガラス表面を効率よくマスキングするための条件を検討した。
8. ヒトサイトメガロウイルスを感染させた細胞から mRNA を抽出し、上記で検討した各種至適条件を用いてラベリングおよびハイブリダイゼーションを行った。
9. マイクロアレイ上のハイブリダイゼーションシグナルを取り込んだ後に解析するためのコンピュータプログラムを検討・開発した。

（倫理面への配慮）

平成12年度の本分担研究においては、その目的とするところが分子生物学的手法を用いた実験系の確立そのものにあつたため、実際のサンプルを得るための研究対象者および実験動物を必要とせず、倫理面での問題はないものと判断した。

C. 研究結果

1. オリゴ DNA を市販のスライドガラス上に効率良く固相化する方法を開発した。次に、均質なマイクロアレイを一度に84枚作製できるマイクロアレイ作製装置およびプログラムソフトウェアを開発した。
2. 2708ヒト遺伝子について80mer のヌクレオチドを設計・合成・アレイ化し、ヒトサイトメガロウイルスを対象としてウイルス感染に伴って変化する宿主遺伝子発現変化を解析し、今年度の目標を達成したことを確認した。
3. 以上の結果をもととして、合成 DNA マイクロアレイ技術に関する4件の特許出願を行った。

D. 考察

本研究の最大の特色は独自に改良・開発した技術を用いて自作の合成 DNA マイクロアレイを用いるところにある。この技術を用いれば、マイクロアレイ化する遺伝子を自由自在に選定、遺伝子数を容易に増加、低コストで大量のアレイを作製できる。

後述の出願特許をもとに大量のマイクロアレイを作製し、可能な限り数多くの各種ウイルス 非許容細胞に対する細胞応答

を明らかにすることにより、比較対照となる各種ウイルス 許容細胞に特異的な遺伝子発現を同定することが可能となる。これらに関する遺伝子がウイルス感染を規定する宿主側因子であり、宿主-寄生体関係を解明する糸口を提供すると期待できる。

ウイルス感染に対する細胞応答のトランスクリプトーム解析に関して、あらゆる生物学領域の先陣をきってスタンフォード大学などの創始グループが最大約 8,000 遺伝子について報告している。今後、さらに対象遺伝子の数を大きくし、大量の情報を得るべく国内外を含めて凌ぎを削っている状況にある。マイクロアレイの技術そのものがいまだに発展途上にあるため、技術的な問題をいかに早く克服して質・量ともに優れたデータを集積できるかどうか成功の鍵があるといえる。本研究は独自のマイクロアレイ技術に基盤を置き、量産へむけるの障害をほぼ克服済みであり、今後、先行するパイオニア等に十分伍していけるものと考ええる。

E. 結論

ウイルス感染における寄生体-宿主関係の解明に有用な合成 DNA マイクロアレイの作製および使用方法を独自に開発した。

F. 健康危険情報

本分担研究は、健康危険情報を特に含んでいない。

G. 研究発表

1. 学会発表

(1) ヒトサイトメガロウイルスによる選択的な宿主遺伝子発現調節

第48回日本ウイルス学会学術集会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

(1) 発明の名称：試料チップ作製用分注
針の洗浄方法

願書番号：特願 2000-53109 号

(2) 発明の名称：ポリヌクレオチドマイ
クロアレイの作製方法、作製装置ならびに
ポリヌクレオチドマイクロアレイ

願書番号：特願 2000-139926 号

(3) 発明の名称：試料チップ作製方法

願書番号：特願 2000-147606 号

(4) 発明の名称：核酸標識方法および核
酸標識用キット

願書番号：特願 2000-254172 号

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

エピジェネティックな変化と HIV の潜伏感染・再活性化に関する研究

分担研究者 渡邊 俊樹 東京大学医科学研究所 助教授

研究要旨：HIV に対する多剤併用化学療法が HIV の潜伏感染している reservoir pool に大して無効である。そこで、HIV の排除を目的とする治療法の基盤を明らかにすることを目的に HIV の潜伏と再活性化の機構を明らかにすることを目指した。本研究では CpG メチル化により不活化されているウイルスのプロモーター-LTR が、LPS 等の刺激により細胞周期依存的に再活性化し、その際特定の部位の CpG 脱メチル化を伴うこと、この部位に特異的に結合する DNA 結合タンパク質が存在することを明らかにした。このタンパク質が刺激依存的脱メチル化と再活性化を規定する分子と考え、その同定・クローニングと機能解析を目指している。

A. 研究目的：

HIV 感染の治療に多剤併用療法が導入され複製ウイルスロードの減少は可能となったが、生体内に残存する潜伏感染細胞の除去方法は未だに開発されていない。一方、DNA 上の CpG のメチル化が遺伝子の発現制御に関与し、ウイルス遺伝子の CpG メチル化による発現抑制はゲノム防御機構の一つと考えられている。我々は、HIV も LTR の CpG のメチル化により遺伝子の発現が抑制されること、細胞外刺激によるウイルス遺伝子の再活性化と LTR 上の CpG サイトの脱メチル化が相関することを見出した。そこで、本研究では細胞外シグナルによる HIV 再活性化における CpG の脱メチル化機構を解明することを目指す。

B. 研究方法

慢性持続感染細胞株及び LPS 刺激により HIV 発現が誘導される HIV トランスジェニックマウス (HIV-Tg) の脾臓細胞を材料に、LPS, TNF- α 等による刺激を加え、HIV の再

活性化を経時的に解析するとともに、染色体 DNA を抽出して bisulfite genomic sequence 法を用いて CpG の脱メチル化部位を詳細に解析した。更に脱メチル化部位を含む塩基配列の oligo プローブと抗体を用いた Electrophoresis mobility shift analysis (EMSA) および super-shift assay にて結合タンパク質の解析を行った、

C. 研究結果：

1) 慢性感染細胞において LTR の CpG メチル化のレベルとウイルス遺伝子発現レベルは逆相関すること、2) TNF- α 等の刺激でウイルス遺伝子発現を誘導すると発現誘導に伴い CpG の脱メチル化が進行すること、3) LPS 刺激による HIV の発現誘導は細胞周期依存的であること、4) その際 LTR 上の部位特異的 CpG 脱メチル化が伴うこと、5) 2ヶ所の特異的脱メチル化部位が CREB/ATF ファミリーの結合配列に相同性を有していること、6) これらの配列には CpG のメチル化の有無に関わらず結合する

共通のタンパク質が存在し、それは既知の CREB/ATF ファミリー転写因子とは異なること、7) この部位には非メチル化配列特異的に複数の核内因子が結合しうることを明らかにした。

D. 考察

これらの結果は、体細胞においても CpG のメチル化レベルが刺激依存的に制御されうることが明らかにした。細胞周期依存性は、細胞外刺激による CpG 脱メチル化が DNA 複製を介する受け身の過程＝メンテナンスメチル化の阻害によることを示唆している。また、発現誘導に伴い部位特異的に脱メチル化がおこることは、HIV LTR のプロモーター活性は、特異的な部位の CpG メチル化によって制御されることを示している。また、2ヶ所の特異的脱メチル化部位をプローブにした EMSA の結果は、CpG のメチル化状態に関わらず共通の DNA 結合タンパク質が結合しうることを示しており、これが脱メチル化部位を規定する未知の特異的結合タンパク質＝脱メチル化の "pilot protein" である可能性を示している。更に、脱メチル化したこの部位のプローブには種々の転写因子が結合し得ることが示された。これらの転写因子が転写の活性化おこることが示唆される。現在、脱メチル化部位を規定する分子の精製と同定の作業を進めている。

E. 結論

本研究により、CpG メチル化による HIVLTR の抑制は特異的な部位のメチル化を介していることが示された。また、脱メチル化部位を規定する pilot protein の存在が示唆されたことは、潜伏 HIV の再活性化機構を理解する重要な手がかりを手に入れ

たことになる。ウイルスの潜伏と再活性化の理解のみならず、CpG メチル化を介した遺伝子発現制御の解析に新たな切り口を提供するものと考ええる。HIVreservoir pool の削減を目指す治療法の基盤を提供する可能性がある。

F. 健康危険情報：該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

(投稿中)

1. Tanaka J, Ishida T, Yasuda J, Iwakura Y and Watanabe T.

Cell cycle dependent HIV-1 reactivation associated with specific demethylation of putative CREB/ATF sites in the LTR. (submitted)

2. 学会発表：

1、国際学会

Keystone Symposia "Control of Viral Latency and Persistence"

Takaomi Ishida, Tsukasa Koiwa, Toshiki Watanabe.

"Cell cycle dependent reactivation of latent HIV-1 associated with demethylation of CpG sites in LTR "

2、国内学会

(1) 第30回日本免疫学会総会

「潜伏 HIV 再活性化における LTR 領域 CpG 脱メチル化の意義」

石田 尚臣、田中 純、小岩 司、安田 二郎、長井 正江、相沢 繁美、岩倉 洋一郎、渡邊 俊樹

(2) 第23回日本分子生物学会年会

「潜伏 HIV 再活性化シグナルによる LTR 領域のメチル化制御」

石田尚臣、小岩 司、田中 純、安田二郎、

岩倉洋一郎、渡邊俊樹

(3) 第48回ウイルス学会学術集会

「潜伏 HIV 再活性化における LTR の CpG メチル化制御」

石田尚臣、田中 純、小岩 司、安田二郎、
長井正江、相沢繁美、岩倉洋一郎、渡邊俊樹

(2) 第14回日本エイズ学会学術集会

「潜伏 HIV 再活性化における LTR 領域 CpG 脱メチル化の意義」

石田尚臣、田中 純、小岩 司、安田二郎、
長井正江、相澤繁美、岩倉洋一郎、渡邊俊樹

(4) 第59回 日本癌学会総会

「細胞外シグナルによる CpG メチル化制御機構」

石田尚臣、小岩 司、田中 純、長井正江、
岩倉洋一郎、渡邊俊樹

(5) 第1回 熊本エイズセミナー

「潜伏 HIV 再活性化における LTR の CpG 脱メチル化の意義」

石田尚臣、小岩 司、長井正江、相沢繁美、
渡邊俊樹

