

厚生科学研究費補助金

## エイズ対策研究事業

HIV 病原性の分子基盤の解明に関する研究

平成12年度 総括研究報告書

主任研究者 山田章雄

平成13(2001)年3月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
HIV 病原性の分子基盤の解明に関する研究	
山田章雄	1
II. 分担研究報告書	
1. HIV-1アクセサリー蛋白質機能ドメインの解析	9
足立昭夫	
2. CD4+T 細胞サブセットの HIV-1感受性と AIDS 病態に関する研究	16
生田和良	
3. HIV-Tat による MHC class II 発現抑制作用と免疫不全	18
岡本 尚	
4. マクロファージにおける HIV の複製効率に関する研究	24
小島朝人	
5. HIV-1 subtype E (CRF01_A/E)分子クローンの樹立と応用	27
佐藤裕徳	
6. HIV-E 型 oligomeric envelope protein gp120-gp41の高次構造と抗原性の解析	33
杉浦 互	
7. ゲノム RNA の複製に関わる宿主因子の解析	35
高橋秀宗	
8. CRF02_AG 組換体の感染性分子クローンの分離とその構造およびウイルス学的性質	38
巽 正志	
9. 日本の HIV-1の遺伝子・分子生物学的解析 (集団解析)	47
仲宗根 正	
10. V3ペプチドの感染促進作用と gp41ペプチドの構造変化抑制能の検討	53
服部俊夫	
11. 細胞表面において HIV-1感染を修飾する因子の解析	58
原田信志	
12. Vpr による宿主細胞周期のかく乱機構に関する研究	64
増田道明	
13. gp41細胞質内部分の構造機能関連	65
松田善衛	
14. Nef の機能解析と治療法の開発	68
松田道行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	73
IV. 研究成果の刊行物・別刷	81

# I. 総括研究報告書

HIV 病原性の分子基盤の解明に関する研究

主任研究者 山田 章雄 国立感染症研究所筑波医学実験用霊長類センターセンター長

研究要旨

1. 昨年度までにサブクラス C に対する感染性 cDNA クローンを樹立したが、本年度は更に A/G, E に対する感染性 cDNA クローンの作出に成功した。
2. エンベロープ蛋白の機能と構造の解析を引き続き行なった結果、サブクラス E に特異的に反応するタンクローン抗体を得た。gp41の機能解析を合成ペプチドを用いて行なうとともに、細胞内ドメインの変異体を作成し、この部位が蛋白の正常な輸送に重要であることを示した。
3. vpr による G2/M アレストの機構を分裂酵母で解析し、Wee1の安定化を介して、アレストが起きることを明らかにした。
4. nef の機能部位を変異体を用いて解析し、ウイルスの感染性に関わる部位と、MHC クラス I 遺伝子のダウンレギュレーションに関わる部位とが分離することを見出した。vif の変異体の中に標的細胞依存性の感染価を示すものが得られた。
5. nef と長期未発症の関係を調べ、nef の機能低下が長期未発症の一因であることを明らかにした
6. tat の重要な生物活性であるトランスアクティベーションを抑制する新規化合物を開発した。
7. ウイルス増殖に関わる宿主因子を解析し、HIV ゲノムを安定化させる宿主因子を新たに同定した。また、マクロファージ内でのウイルス増殖は V3ループの塩基配列によって調節されている可能性を示した。未熟 T 細胞マーカーである CD38の発現の有無と HIV の細胞指向性が IL-4を介して関連していることを示した。更に、樹状細胞に発現されている DC-SIGN 分子の *in vitro* 発現系を構築した。
8. タイと日本における母子感染の様式を比較し、両者に大きな差は認められないことを明らかにした。

分担研究者

生田和良	阪大微研	教授
足立昭夫	徳島大・医	教授
岡本 尚	名古屋市大・医	教授
小島朝人	国立感染症研究所	室長
佐藤博徳	国立感染症研究所	主任研究官
杉浦 互	国立感染症研究所	グループ長
巽 正志	国立感染症研究所	主任研究官
仲宗根 正	国立感染症研究所	主任研究官
原田信志	熊本大・医	教授
高橋秀宗	国立感染症研究所	主任研究官
服部俊夫	東北大・医	教授
松田善衛	国立感染症研究所	室長
増田道明	東大・医	助教授
松田道行	阪大微研	教授

A. 研究目的

HIV はウイルス感染者体内で著しい多様性を示し、感染初期には比較的病原性の低い NSI タイプのウイルスがドミナントであるが、永い潜伏期の後、病原性の高い SI タイプへ変化することが発症と深く関わっていると考えられている。またエイズの爆発的流行地では母子感染の防止がエイズ対策において極めて重要であるが、特定のウイルス集団が母子感染に関わっていることが示唆されている。グローバルに見た場合には様々なサブタイプのウイルスが流行しており、各ウイルスの病原性も含め世界に流行するウイルスはダイナミックな変化をしているものと考えられる。本研究では HIV の個体レベル並びに集団レベルでのダイナミズムを特に病原性の側面から明らかにすることを目的とする。一方、エイズ制圧の有効な手段としてのワクチン開発は未だに成功していない。本研究では有効かつ安全なワクチン開発への道を拓

くことを可能にするをも念頭に置きつつ、HIV 並びに SIV の病原性の分子的な基盤を明らかにする。

B. 研究方法

感染性 cDNA クローンは long PCR あるいはファージベクターへのクローニングによった。ウイルス遺伝子の機能解析は感染性クローンへの変異導入によって行なった。一部は分裂酵母並びにその変異体も用いた。また gp41の機能解析には合成ペプチドを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では様々な臨床分離ウイルスが使用されているが、それらのウイルスが分離された患者情報については厳密に管理されており、個人情報が増えることのないように細心の注意を払っている。サルを用いた実験は国立感染症研究所動物実験委員会による倫理審査を受け承認されている。

C. 研究結果

1. 感染性 cDNA クローンの樹立(巽・佐藤)  
アフリカで流行しているサブタイプ C の感染性クローンを MAGIC-5によるウイルスのプラーククローニングと long PCR を用いて世界に先がけて樹立することに成功した。同様の方法を用いアフリカで流行している A/G レコンビナントに関しても感染性 cDNA の作成に成功した。一方、サブタイプ E に関しては非組込型環状 DNA をファージベクターにクローニングすることにより樹立した。培養細胞にトランスフェクトするといずれのクローンも元のウイルスと同一のレセプタートロピムズを呈する感染性ウイルスを産生した。しかし、サブタイプ C 以外では PBMC でのウイルス増殖

が殆ど認められず親ウイルスとは完全に一致はしていないことも明らかとなった。

2. env 産物の構造と機能(服部、松田善、杉浦)  
gp41は細胞融合ならびに gp120のウイルス粒子への取込みに重要であると考えられているが、本研究では gp41の一部に相当する合成ペプチドと、ウイルス中和活性を有する単クローン抗体を用いて構造と機能の関連を解析した。その結果 gp41の N 側に対する単クローン抗体には中和活性が認められるが、N 側および C 側のペプチドを混合したときに出現するエピトープを認識する抗体には中和活性が認められないことを明らかにした。また、これらのペプチドは X4ウイルスをより効率的に抑制することを明らかにしたが、これは CXCR4を含む7回膜貫通蛋白と gp41由来ペプチドが結合するためであることを示した。

gp41の細胞内ドメインには両親媒性で Arg に富む a-helix 構造がタンデムに2つ連らなっている。この構造の機能との関連を解析するため数種の変異体を作成した。変異体の解析の結果、Arg 単独の変異では表現系の変化は認められないが、N 側の a-helix 内での stop あるいはフレームシフトによって、エンベロープ蛋白の発現が顕著に低下することを明らかにした。

3. 調節遺伝子、修飾遺伝子の産物の機能と構造に関する研究

vpr による宿主細胞の G2M 期アレストの機構解析を分裂酵母で行ない Wee1, Rad24, Ppa2 等の宿主因子がアレストに及ぼす影響を調べた。Vpr は Wee1の過リン酸化と量の増加を促した。種々の変異酵母を用いた実験から、リン酸化された Wee1が Rad24依存的に安定化し、その結果アレストが生じる可能性を示した(増田)。

Nef および Vif の変異体を作成し、その機能に及ぼす影響を調べたところ、Nef によるウイルスの感染性と MHC クラス I 遺伝子 down regulation が乖離できることを示した。Vif への変異の導入により、標的細胞依存性の感染価を示すものが得られた。(足立)

また、長期未発症者(LTNP)では Nef 欠損ウイルスに感染していることがあり、この蛋白と病態に関して明らかにする必要がある。そこで、Nef のウイルス増殖における役割を効率よく検出できる MAGNEF 細胞を樹立し、LTNP 患者からのウイルスについて調べたところ、Nef の機能低下が、LNTN と関連することが明らかになった。(松田道)

4. ウイルス増殖にかかわる宿主因子の解析

Tat が基本転写因子 TFIIF の構成蛋白である CDK7の酵素活性の活性化を促すことから、CDK7を HIV の治療標的とすることを考えた。CDK7の基質 CDK2の変異体に核移行シグナルを付加した NLS-mC2p を合成したところ、Tat による転写のトランスアクティベーションを抑制することが明らかになった。一方、フルオロキノリン誘導体 K-37の HIV 増殖抑制活性の機構を解析し、K-37が Tat をはじめとする RNA 依存性トランスアクティベーターを阻害することにより、ウイルス増殖抑制活性を呈することを明らかにした。(岡本)  
これまで HIV c DNA の合成に宿主のトポイソメ

ラーゼが関わることを報告してきたが、この酵素のアミノ末端に結合する C23について検討したところ、HIVgag 蛋白の発現量の上昇を認めたが、これは C23によりゲノム RNA の安定性が増したことによることを明らかにした。(高橋)

樹状細胞に発現している DC-SIGN が HIV の感染を阻止するかを知るために可溶性 DC-SIGN の発現を試み、小規模での精製を可能にした。(原田)  
V3領域が HIV の指向性を決定するが、X4ウイルスのマクロファージでの低増殖性は co-receptor では説明できない。V3領域のアミノ酸配列を保持させたまま、塩基配列のみを変更したウイルスを作成したところ、マクロファージでのみ低増殖性を示す株が存在した。この部位の塩基配列が極めて重要であることが明らかになった。(小島)

HIV 感染者で上昇する CD38陽性 T 細胞とウイルスの指向性について解析したところ、CD38陽性 T 細胞が T 細胞指向性ウイルスに、陰性細胞がマクロファージ指向性ウイルスに感受性が高いことが明らかになった。陽性細胞分画から産生される IL-4がこの感受性に関わっていることが明らかになった。(生田)

5. HIV 個体内集団内での変異の解析

日本およびタイ国における HIV の分子疫学的解析を行ない、日本では母子共に様々なサブタイプが混在するが、タイにおいては母子ともに、サブタイプ E のみの均一な集団であることを明らかにした。(仲宗根)

D. 考察

本研究では HIV 病原性の分子的基盤を知る目的で、ウイルス遺伝子にコードされる蛋白の機能解析を中心とし、細胞レベルあるいは個体レベルでのウイルス増殖に及ぼす宿主因子の解析などを行なった。その過程で、新たなクレードに対する感染性 cDNA クローンを樹立することもできた。これらの成果をもとに、さらに HIV 各遺伝子の機能を解析し、ウイルス病原性の理解を深め、新規ウイルス阻害剤、ワクチンの開発につなげる必要がある。

E. 結論

HIV 病原性を分子レベルで理解することを目的として研究を行い、複数のサブタイプに対する感染性クローンの樹立、宿主遺伝子の多様性とエイズ病態との関連、ウイルスの調節遺伝子の機能、ウイルス増殖に関わる宿主因子などを明らかにした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Suzuki, S., Tobiume, M., Kameoka, M., Sato, K., Takahashi, TA., Mukai, T., and Ikuta, K.: Exposure of normal monocyte-derived dendritic cells to human immunodeficiency virus type-1 particles leads to the induction of apoptosis in co-cultured CD4+ as well as CD8+ T cells. Microbiol.

Tahara-Hanaoka S, Ushijima Y, Tarui H, Wada M, Hara T, Imanishi S, Yamguchi T, Hattori T, Nakauchi H, Koito A. :Differential level in co-down-modulation of CD4 and CXCR4 primed by HIV-1 gp120 in response to phorbol ester, PMA, among HIV-1 isolates. *Microbiol. Immunol.* 44:489-498, 2000

Li S-L, Zhang X, Ling H, Ikeda J, Shirato K, Hattori T. :A VSV-G pseudotyped HIV vector mediates efficient transduction of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Microbiol. Immunol.* 44:1019-1025, 2000

Taniguchi Y, Zolla-Pazner S, Xu Y, Zhang X, Takeda S, Hattori T. :A Human Monoclonal Antibody (98-6) Reacts with the Fusogenic Form of gp41. *Virology* 273:333-340, 2000

Xu Y, Zhang X, Matsuoka M, Hattori T. :The possible involvement of CXCR4 in the inhibition of HIV-1 infection mediated by DP178/gp41. *FEBS Letters* 487:185-188, 2000

Ling H., Zhang X., Liu Y., and Hattori T. V3 loop peptides enhance their own binding to cells and human immunodeficiency type 1 infection. 投稿中

K. Mori, Y. Yasutomi, S. Ohgimoto, T. Nakasone, S. Takamura, T. Shioda and Y. Nagai. A quintuple deglycosylation mutant of SIVmac239 in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild type strain. *J Virol.* 2001, in press.

T. Hara, N. Yoshino, N. Takayama, M. Minamitani, S. Naganawa, H. Ohkubo, M. Takizawa, Y. Izumi, M. Kantake, S. Suzuki, M. Takano, T. Kita, R. Totani, Y. Nagai, M. Honda and T. Nakasone. Presence of multiple HIV-1 subtypes among mothers and children in Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: in press. 2001.

Sasaki, Y., Y. Ami, T. Nakasone, K. Shinohara, E. Takahashi, S. Ando, K. Someya, Y. Suzaki, and M. Honda. Induction of CD95 ligand expression on CD8+ T-lymphocyte correlates with HLA-DR expression and contributes to apoptosis of CD95-upregulated CD4+ T-cells in macaques by infection with a pathogenic simian/human immunodeficiency virus. *Clin Exper Immunol.* 122:381-389, 2000

Nakasone T, Shinohara K, Ami Y, Yoshino N, Kaizu M, Takahashi E, Touzjian N, Lu Y, Nagai Y and Honda M. SHIV carrying C1-V3 of HIV-1 subtype E infected to a cynomolgus monkey. *J. Med. Primatol.*, 29:294, 2000

Suzuki, M., Tetsuka, T., Yoshida, S., Watanabe, N., Kobayashi, M., Matsui, N. and Okamoto, T. : 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.

Mori, T., Okamoto, H., Takahashi, N., Ueda, R., and Okamoto, T. : Aberrant overexpression of 53BP2 mRNA in lung cancer cell lines. *FEBS Lett.* 465:124-128. 2000.

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.

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.* 346:641-649. 2000.

Kajino, S., Suganuma, M., Teranishi, F., Takahashi, N., Tetsuka, T., Ohara, H., Ito, M. and Okamoto, T. : Evidence that de novo protein synthesis is dispensable for anti-apoptotic effects of NF- $\kappa$ B. *Oncogene* 19: 2233-2239. 2000.

Kanazawa, S., Okamoto, T., Matija Peterlin, B. : Tat competes with C $\tau$ TA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class I genes in HIV infection. *Immunity* 12:61-70, 2000.

Okamoto, H., Cujec, T.P., Matija Peterlin, B. and Okamoto, T. : HIV-1 replication is inhibited by a pseudo-substrate peptide that blocks Tat transactivation. *Virology* 270:337-344, 2000.

Kobayashi, K., Matsumoto, S., Morishima, T., Kawabe, T. and Okamoto, T. : Prevention of cancer metastasis by cimetidine through blocking the expression of E-selectin on endothelial cells. *Cancer Res.* 60:3978-3984, 2000.

- Okamoto, H., Cujec, T. P., Okamoto, M., Matija Peterlin, B., Baba, M. and Okamoto, T. : Inhibition of the RNA-dependent transactivation and replication of human immunodeficiency virus type 1 by a fluoroquinoline derivative K-37. *Virology* 272:402-408, 2000.
- Nagaya, T., Fujieda, M., Otsuka, G., Yang, J-P., Okamoto, T., and Seo, H. : A potential role of activated NF- $\kappa$  B in the pathogenesis of euthyroid sick syndrome. *J. Clin Invest.* 106:393-402, 2000.
- Okamoto, H., Asamitsu, K., Nishimura, H., Kamatani, N., Okamoto, T. : Reciprocal modulation of transcriptional activities between HIV-1 Tat and MHC class I transactivator C $\tau$ A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279:494-499, 2000.
- Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Shimizu, M., Itoh, M., and Okamoto, T. : Involvement of TLS/FUS in the NF- $\kappa$  B p65-Mediated Transactivation. *J. B. C* (in press)
- Senoo, M., Tsuchiya, I., Saito, Y., Mori, T., Okamoto, T., Masuzawa, M., Kato, H., and Habu, S. : Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene, which encodes both the tumor suppressor protein p51 and its dominant-negative form p73L, in human skin cancers. *Br. J. Cancer* (in press)
- Shino T, Kato K, Kodaka N, Miyakuni T, Takebe Y, Sato H: A group of V3 sequences of human immunodeficiency virus type I subtype E nonsyncytium-inducing, CCR5-using variants are resistant to positive selection pressure. *J. Virol.* 74: 1069-1078, 2000.
- Toda M, Sato H, Takebe Y, Taniguchi Y, Saito S, Inoue S, Takemori T, Sakaguchi M: Inhibition of immunoglobulin E response to Japanese cedar pollen allergen (Cry j 1) in mice by DNA immunization: different outcomes dependent on the plasmid DNA inoculation method. *Immunology.* 99:179-86, 2000.
- Sato H, Tomita Y, Shibamura K, Shiino T, Miyakuni T, and Takebe Y: Convergent evolution of reverse transcriptase (RT) genes of human immunodeficiency virus type 1 subtypes E and B following nucleoside analogue RT inhibitor therapies. *J. Virol.* 74(11):5357-5362, 2000.
- Nakayama EE, Hoshino Y, Xin X, Liu H, Goto M, Watanabe N, Taguchi H, Hitani A, Kawana-Tachikawa A, Fukushima M, Yamada K, Sugiura W, Oka SI, Ajisawa A, Sato H, Takebe Y, Nakamura T, Nagai Y, Iwamoto A, Shioda T: Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype. *J. Virol.* 74(12):5452-5459, 2000.
- Kato K., Kusagawa S, Motomura K, Yang R, Shiino T, Nohtomi K, Sato H, Shibamura K, Tran Hien N, Kim Chi P, Hong Thang P, Cong Thanh D, Cuong Quoc N, Duc Thang B, Thuy Long H, Yamazaki S, Nagai Y, Takebe Y. Cross-border spread of closely related CRF01 variants circulating among injecting drug users in Northern Vietnam across the Vietnam-China border. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* In press.
- Takahashi, H., Iwata, T., Kitagawa, Y., Shoya, Y., Takahashi, RH., Nagashima, K., Kurata, T. Monoclonal antibodies against topoisomerase I suppressed DNA relaxation and HIV-1 cDNA synthesis. *Hybridoma*, 19: 331-334, 2000
- Maeda, Y., Foda, M., Matsushita, S., and Harada, S.: Involvement of both the V2 and V3 region 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.
- Yoshida, A., Shimomoto, J., Koh, K.-B., Fujita, M., and Adachi, A. 2000. The H9M8 166 tropism of various HIV mutants is determined by distinct cellular factors. *International Journal of Molecular Medicine* 5:291-294.
- Akari, H., Arold, S., Fukumori, T., Okazaki, T., Strebel, K., and Adachi A. 2000. Nef-induced major histocompatibility complex class I down-regulation is functionally dissociated from its virion incorporation, enhancement of viral infectivity, and CD4 down-regulation. *Journal of Virology* 74:2907-2912.
- Akari, H., Fukumori, T., and Adachi, A. 2000. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions. *Journal of Virology* 74:4891-4893.
- Yoshida, A., Miyaura, M., Sakurai, A., Fukumori, T., Fujita, M., Akari, H., and Adachi, A. 2000. MHC-I expression in HTLV-1-positive and -negative cells. *International Journal of Molecular Medicine* 6:83-86.

Koyama, A.H., Arakawa, T., and Adachi, A. 2000. Characterization of apoptosis induced by sorbitol: a unique system for the detection of antiapoptotic activities of viruses. *Microbes and Infection* 2:599-606.

Hashinaka, K., Nishikata, I., Hashida, S., Adachi, A., Oka, S., and Ishikawa, E. 2000. Preparations of recombinant HIV-1 p66 antigen to improve the specificity of immune complex transfer enzyme immunoassay of antibody IgG to HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 14:169-179.

Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Fujita, M., Koyama, A.H., and Adachi, A. 2000. Mutational analysis of HIV-1 Gag proteins. *International Journal of Molecular Medicine* 6:265-269.

Koh, K.-B., Fujita, M., and Adachi, A. 2000. Elimination of HIV-1 plasmid DNA from virus samples obtained from transfection by calcium-phosphate co-precipitation. *Journal of Virological Methods* 90:99-102.

Fukumori, T., Akari, H., Yoshida, A., Fujita, M., Koyama, A.H., Kagawa, S., and Adachi, A. 2000. Regulation of cell cycle and apoptosis by HIV-1 Vpr. *Microbes and Infection* 2:1011-1017.

Akari, H., Yoshida, A., Fukumori, T., and Adachi, A. 2000. Host cell-dependent replication of HIV-1 mutants with deletions in gp41 cytoplasmic tail region is independent of the function of Vif. *Microbes and Infection* 2:1019-1023.

Koyama, A.H., Fukumori, T., Fujita, M., Irie, H., and Adachi, A. 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes and Infection* 2:1111-1117.

Hashinaka, K., Hashida, S., Nishikata, I., Adachi, A., Oka, S., and Ishikawa, E. 2000. Recombinant p51 as antigen in an immune complex transfer enzyme immunoassay of immunoglobulin G antibody to human immunodeficiency virus type 1. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7:967-976.

Koh, K.-B., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Fujita, M., and Adachi, A. 2000. Cell-dependent gag mutants of HIV-1 are crucially defective at the stage of uncoating/reverse transcription in non-permissive cells. *Microbes*

and *Infection* 2:1419-1423.

Isaka, Y., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Sugimoto, H., Adachi, A., Hayami, M., Yoshie, O., Fujiwara, T., and Sato, A. 2000. Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus variants that are resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Archives of Virology* 145:2481-2492.

Isaka, Y., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Sugimoto, H., Adachi, A., Miura, T., Hayami, M., Yoshie, O., Fujiwara, T., and Sato, A. 2001. A single amino acid change at Leu-188 in the reverse transcriptase of HIV-2 and SIV renders them sensitive to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Archives of Virology*, in press

Kusagawa, S., Takebe, Y., Yang R., Motomura, K., Ampofo, W., Brandful, J., Koyanagi, Y., Yamamoto, N., Sata, T., Ishikawa, K., Nagai, Y. and Tatsumi, M. Isolation and characterization of full-length molecular DNA clone of Ghanaian HIV-1 intersubtype A/G recombinant (CRF02\_AG) which is replication-competent in restricted host-range. *AIDS Res Hum Retroviruses* in press.

Hachiya, A., Aizawa-Matsuoka, S., Tanaka, M., Takahashi, Y., Ida, S., Gatanaga, H., Hirabayashi, Y., Kojima, A., Tatsumi, M. and Oka, S. : Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 by using CCR5-expressing HeLa/CD4 cell clone 1-10 (MAGIC-5) *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 495-501.

Hachiya, A., Aizawa-matsuoka, S., Tanaka, M., Takahashi, Y., Ida, S., Gatanaga, H., Hirabayashi, Y., Kojima, A., Tatsumi, M., and Oka, S.: Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 by using CCR5-expressing HeLa/CD4 cell clone 1-10 (MAGIC-5). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (in press).

Ohba, H., Soga, T., Tomozawa, T., Nishikawa, Y., Yasuda, A., Kojima, A., Kurata, T. and Chiba, J. : An immunodominant neutralization epitope on the thumb subdomain of HIV-1 reverse transcriptase revealed by phage display antibodies. *J. Gen. Virol.* (in press).



学会発表

Mukai, T., Auwanit, W., Kurosu, T., and Ikuta, K. Full sequence and construction of infectious DNA clone of human immunodeficiency virus type 1 subtype A/E 5th Asia Pacific Congress of Medical Virology. Bali, Indonesia, 2000

K. Balachandra, N. Bhamarapravati, J. Boon-Loon, A. Boonthum, R. Butraporn, P. Puthavathana, K. Ruxrungtham, S. Siritantikorn, N. Sittisombut, B. Sriwanthana, R. Sutthent, D. Thawaranantha, P. Warachit, Y. Ami, T. Asano, T. Hamano, T. Hara, S. Horibata, Y. Sasaki, Y. Izumi, M. Kaizu, M. Kawahara, K. Matsuo, T. Ohsu, K. Shinohara, E. Takahashi, M. Takizawa, N. Yoshino, T. Nakasone, Y. Nagai, S. Yamazaki and M. Honda. The HIV Vaccine Research and Development: Results of a Collaborative Study. 2nd Congress of the Federation of Immunological Societies of Asia-Oceania (FIMSA) Bangkok, January 23-27, 2000.

Tadashi Nakasone, Junki Takamatsu, Kaneo Yamada, Yoshiyuki Nagai, Mitsuo Honda. Biological and genetic analysis of HIV-1 in Japan: 12 years observation. Japan - U. S. A. AIDS ( Santa Fe 3. 2000).

Shuji Ando, Naoto Yoshino, Yasushi Ami, Katsuaki Shinohara, Kenji Someya, Takashi Kitamura, Tadashi Nakasone, Mitsuo Honda. Immunological Analysis of SHIV Challenged Monkeys. Japan - U. S. A. AIDS (Santa Fe 3. 2000).

Tadashi Nakasone, T. Hara, S. Naganawa, J. Takamatsu, M. Kaizu, M. Takizawa, T. Ohsu, M. Kawahara, Y. Izumi, N. Yoshino, K. Yamada, Y. Nagai, M. Honda. Biological and genetic analysis of HIV-1 in Japan: 12 years observation. The 13th International AIDS Conference (9-14 July 2000 Durban South Africa).

Naoto Yoshino, T. Ryu, Y. Ami, K. Shinohara, M. Kaizu, Y. Izumi, T. Nakasone, M. Honda. Pathogenic SHIV induce dysplastic hematopoiesis which may be resulted from the effect on hematopoietic progenitor cells and may affect progression to disease-state in monkeys. The 13th International AIDS Conference (9-14 July 2000 Durban South Africa).

Katsuaki Shinohara, K. Sakai, E. Takahashi, Y. Ami, Y. Sasaki, N. Yoshino,

Y. Suzuki, T. Nakasone, M. Honda. A pathogenic SHIV-C2  $\Delta$ -cynomolgus monkey model for evaluation of HIV vaccine candidates. The 13th International AIDS Conference (9-14 July 2000 Durban South Africa).

Totani, R., M. Kihara, T. Kita, M. Honda, N. Yoshino, T. Nakasone, Y. Tsukahara, N. Takayama, and K. Shibata. National co-operative study on vertical transmission of HIV-1 in Japan. The 13th International AIDS Conference (9-14 July 2000 Durban South Africa).

Hiroshi Yamamoto, Kazuki Katsuyama, Yukiko Nakada, Tadashi Nakasone, Yasushi Ami, Kouichi Shiosaki, Katsuaki Shinohara, Yasuyuki Eda, Youichiro Kino, Yukio Tokiyoshi, Eiji Takahashi, Yuriko Suzuki, Masahiko Kaizu, Naoto Yoshino, Mitsuo Honda. Induction of P9 peptide-specific CTL activity in Rhesus Monkeys vaccinated with HIV-HBc chimeric particles. 18th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (Oct. 2000 Wisconsin).

木ノ木正信、河本聡志、小林剛、向井 徹、Wattana Auwanit、黒須剛、堀越東子、生田和良 タイ E 型 HIV-1分離株の解析 第14回近畿エイズ研究会 学術集会、大阪、2000

河本聡志、木ノ木正信、向井 徹、小林 剛、黒須剛、大竹 徹、生田和良 タイ E 型 HIV-1分離株のアポト-シス誘導能 第48回日本ウイルス学会 総会、津、2000

黒須 剛、向井 徹、河本聡志、木ノ木正信、生田和良 HIV-1タイ型5'LTR, Y 領域の塩基配列の特徴と、その機能解析 第48回日本ウイルス学会 総会、津、2000

向井 徹、黒須 剛、白神未来、河本聡志、木ノ木正信、堀越東子、生田和良 HIV-1分子的クロン群の調製 第48回日本ウイルス学会総会、津、2000

堀越東子、木ノ木正信、笹尾芙蓉子、向井 徹、生田和良 CD4+T 細胞サブセット間の HIV-1感受性に関する比較解析 第48回日本ウイルス学会総会、津、2000

向井 徹、白神未来、黒須 剛、河本聡志、木ノ木正信、生田和良 HIV-1感染性 DNA からのウイルスクローニング 第14回日本エイズ学会総会、京都、2000

木ノ木正信、堀越東子、河本聡志、黒須 剛、向井徹、大竹 徹、生田和良 サブタイプ A/E HIV-1臨床分離株のウイルス学的解析 第14回日本エイズ学会総会、京都、2000

黒須 剛、向井 徹、生田和良 HIV-1 サブタイプ B、AE、C の Tat 活性比較 第14回日本エイズ学会総会、京都、2000

吉野直人、網康至、篠原克明、海津雅彦、泉泰之、柳富子、仲宗根正、本多三男、劇症型非ヒト霊長類 HIV/AIDS 動物モデルの開発およびその病態の解析。第47回日本実験動物学会総会 (2000. 5/21-23 徳島)。

山本博、勝山一輝、仲宗根正、網康至、塩先巧一、篠原克明、江田康幸、城野洋一郎、時吉幸男、高橋栄治、須崎百合子、海津雅彦、吉野直人、本多三男。遺伝子工学により作製したエイズワクチンのサル疾患モデルにおける研究 1. HIV-HBc キメラ粒子ワクチンのサルにおける CTL 誘導。第47回日本実験動物学会総会 (2000. 5/21-23 徳島)。

高野政志、戸谷良造、喜多恒和、井村総一、大久保秀夫、大場悟、杉浦互、須藤寛人、塚原優己、外川正生、仲宗根正、早川智、本多三男、保田仁介、吉野直人。HIV 母子感染に関する臨床的研究第1報-本邦における妊産婦の HIV-1抗体検査率の全国調査- 第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

喜多恒和、戸谷良造、井村総一、大久保秀夫、大場悟、杉浦互、須藤寛人、高野政志、塚原優己、外川正生、仲宗根正、早川智、本多三男、保田仁介、吉野直人。HIV 母子感染に関する臨床的研究第2報-産婦人科領域からの全国調査成績- 第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

大久保秀夫、戸谷良造、喜多恒和、井村総一、大場悟、杉浦互、須藤寛人、高野政志、塚原優己、外川正生、仲宗根正、早川智、本多三男、保田仁介、吉野直人。HIV 母子感染に関する臨床的研究第3報-小児科領域からの全国調査結果- 第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

戸谷良造、喜多恒和、井村総一、大久保秀夫、大場悟、杉浦互、須藤寛人、高野政志、塚原優己、外川正生、仲宗根正、早川智、本多三男、保田仁介、吉野直人。HIV 母子感染に関する臨床的研究第4報-HIV 母子感染予防対策マニュアルについて- 第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

阪井弘治、篠原克明、高橋栄治、網康至、佐々木裕子、吉野直人、須崎百合子、仲宗根正、本多三男。カニクイザルに病原性を示す SHIV-C2A株の分子クローニング。第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

本多三男、仲宗根正、松尾和浩、大洲竹晃、吉野直人、滝澤万里、浜野隆一、海津雅彦、原敬志、川原守、泉泰之、堀端重男、兼清優、浜武牧子、網康至、篠原克明、佐々木裕子、阪井弘治、高橋

栄治、山本博、永井美之、山崎修道。本邦における遺伝子組換えワクチン (リコンビナント AIDS ワクチンの開発状況) 第14回エイズ学会学術集会・総会・シンポジウム (2000. 11/28-30 京都)

武田哲、中里見哲也、吉崎ひとみ、染谷健二、吉野直人、仲宗根正、安藤秀二、芳賀伸治、塩先巧一、深田勝彦、時吉幸男、本多三男。HVJ リポソームは HBc-HIV ワクチンで免疫した場合のヘルパー T の応答に有効に働く。第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

泉泰之、吉野直人、海津雅彦、網康至、篠原克明、仲宗根正、浅野敏彦、本多三男。HIV/AIDS サルモデルにおける CD4の減少と接着因子の相関。第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

原敬志、仲宗根正、吉野直人、井村総一、大久保秀夫、大場悟、鈴木三郎、須藤寛人、高野政志、高山直秀、塚原優己、外川正生、早川智、保田仁介、喜多恒和、戸谷良造、浜野隆一、Tawee Chotpitayasunondh、Pajit Warachit、本多三男。垂直感染 HIV の V3PND 領域の多クローン解析。第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

長縄聰、相澤知恵子、佐藤成大、高橋清実、D. Nossik、仲宗根正、本多三男、栃久保修、北村勝彦。ロシア協和国における HIV-1感染症の分子生物学的手法を用いた流行解析。第14回エイズ学会学術集会・総会 (2000. 11/28-30 京都)

草川茂、武部豊、楊栄閣、本村和嗣、石川晃一、William Ampofo、Jim Brandful、小柳義夫、山本直樹、永井美之、巽正志; CRF02\_AG 組換体の感染性分子クローンの分離とその構造およびウイルス学的性質。第48回日本ウイルス学会 2000年10月、津。

巽正志、佐藤裕徳、富田康浩、加藤佳代子、草川茂、楊栄閣、本村和嗣、納富香子、芝村佳代、永井美之、武部 豊 ; CRF01\_AE 組換体の感染性分子クローンの分離とそのウイルス学的性質。第48回日本ウイルス学会 2000年10月、津。

飛梅 実、徳永研三、望月直樹、巽 正志、松田道行; HIV-1のアクセサリ-蛋白 Nef のウイルス感染性増強作用の解析。第48回日本ウイルス学会 2000年10月、津。

庄谷祐子、上野智規、巽 正志、高橋秀宗、佐多徹太郎; サル細胞における HIV-1複製制御機構の解析。第48回日本ウイルス学会 2000年10月、津。

原田貴之、北川善紀、巽 正志、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人 ; HIV ビリオン細胞侵入過程の無細胞解析系。第48回日本ウイルス学会 2000年10月、津。

佐藤裕徳、芝村佳代、蜂谷敦子、巽 正志、富田康治、椎野禎一郎、宮国 毅、具志一男、岡 慎一、永井美之、武部 豊；HIV-1薬剤耐性の進化。第48回日本ウイルス学会 2000年10月 津。

巽 正志、蜂谷敦子；HIV-1感染価迅速測定細胞MAGIC-5/SEAP について。第14回日本エイズ学会 2000年11月 京都。

蜂谷敦子、高橋由紀子、松岡佐織、土屋まこと、田中真理、井田節子、平林義弘、巽 正志、岡 慎一；MAGIC-5/SEAPを用いた High Through-Put な Phenotypic Resistance Assay について。第14回日本エイズ学会 2000年11月 京都。

佐藤克彦、村上貴哉、森下高行、多和田行男、羽根田進、巽 正志、金田次弘；MAGIC-5A を用いた薬剤感受性試験の確立。第14回日本エイズ学会 2000年11月 京都。

須藤弘二、斉藤隆行、近藤真規子、島 貴子、西沢雅子、蜂谷敦子、岡 慎一、巽 正志、今井光信。第14回日本エイズ学会 2000年11月 京都。

佐藤裕徳、芝村佳代、蜂谷敦子、巽 正志、富田康治、椎野禎一郎、宮国 毅、具志一男、海老沢計慶、梅山秀明、岡 慎一、永井美之、武部 豊；HIV-1 subtype E(CRF01\_AE)薬剤耐性の進化。第14回日本エイズ学会 2000年11月 京都。

Mohamed Foda, Shinji Harada, and Yosuke Maeda; ROLE OF VARIABLE DOMAINS ON A DUALTROPIC HIV-1 ENVELOPE GP120 IN CCR5 CORECEPTOR UTILIZATION、第14回日本エイズ学会総会、2000年11月、京都。

Wei Song, Yosuke Maeda, Keisuke Yusa, Yuetsu Tanaka and Shinji Harada; COLOCALIZATION OF CD4 AND CXCR4 INDUCED BY CAPSIANOSIDE G ENHANCES X4 HIV-1 INFECTION、第14回日本エイズ学会総会、2000年11月、京都。

天白晶、前田洋助、原田信志；HIV-1の感染を促進する細胞性因子の解析、第48回日本ウイルス学会総会、2000年10月、三重。

遊佐敬介、宋薇、Matthias Bartelmann、原田信志；薬剤耐性関連変異をもつ HIV-1ライブラリーの作製、第48回日本ウイルス学会総会、2000年10月、三重。

前田洋助、原田信志；2種類のリポーター HIV による重感染細胞の同定、第48回日本ウイルス学会総会、2000年10月、三重。

原田信志、前田洋助；HIV-1の多重感染による細胞死の解析、第48回日本ウイルス学会総会、2000

年10月、三重。

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許出願（巽 正志）

1) 「HIV 感染価測定用細胞」出願番号 特願2000-319181

2) 「HIV の薬剤耐性の試験法」出願番号 特願2000-319189

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## II. 分担研究報告書

## HIV-1 アクセサリー蛋白質機能ドメインの解析

分担研究者 足立昭夫（徳島大学医学部ウイルス学教室）

**研究要旨** 新たに作製した種々の in-frame 変異体を用い HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vif 及び Nef の機能領域を解析した。Nef にはウイルス複製の増強だけでなく様々な生物活性があることが報告されている。本研究では、Nef の MHC-I down-regulation 能に関わる N 末 20 番目のアミノ酸（メチオニン）の変異はウイルス感染性（培養細胞中）や CD4 down-regulation 能に影響を与えないことが明らかになった。Vif はリンパ球やマクロファージでのウイルス複製に必須であることが知られているが、機能領域に関する情報はほとんどなかった。本研究において、Vif は産生細胞依存性ばかりでなく標的細胞依存性にも働き、標的細胞依存性には major hydrophilic region や effector region が関与していることが示された。これらの結果は HIV-1 Vif 及び Nef の作用機構を解明する上で非常に重要な知見である。

### A. 研究目的

HIV-1 のアクセサリー蛋白質の機能に関する研究は遅れており、その作用機構の分子基盤はほとんど明らかにされていない。Vif と Nef はそれぞれ、自然宿主細胞でのウイルス複製、感染個体のエイズ発症に極めて重要であることが報告されているが、その詳細は不明である。Vif に関する系統的な変異体解析は始まったばかりであるし、Nef の生物活性に関しては多くの報告があるものの、相互の関係を系統的に解析したものは少ない。本研究では、HIV-1 の生物学の理解に極めて重要な Vif と Nef とについて系統的な変異体解析を行ない、その結果を既知の構造／機能に関する情報と比較検討した。これにより Vif 及び Nef の機能の本態解明を目指した。

### B. 研究方法

HIV-1 の感染性分子クローン pNL432 から Nef（図1）と Vif（図2）に関する一連の in-frame 変異体を試験管内で作製した。それぞれの変異体につき、感染性（Nef 及び Vif）、ウイルス蛋白質の発現（Nef 及び Vif）、MHC-I 及び CD4 down-regulation（Nef）等をトランスフェクション、ウエスタンブロットティング、FACS、MAGI assay、CAT assay などで解析した。解析結果を既知の構造／機能に関する情報と総合した。

### C. 研究結果

図1に示した Nef 変異体 NL-M20A と NL-M20R はウイルス蛋白質の発現能、粒子の構成蛋白質、CD4 down-regulation 能、感染性に異常が認められないが、MHC-I

down-regulation 能を欠いていた。これらの変異体に感染したヒトリンパ球は CTL による細胞障害を受けやすかった。これらの変異体の変異部位は図 1 に示したように N 末の  $\alpha$  helix 領域にあった。図 2 に示した Vif 変異体 KS400 と KS408 は他の Vif 変異体と同じく、ウイルス蛋白質の発現能、子孫ウイルス粒子の産生量、粒子の構成蛋白質に異常が認められないが、標的細胞依存性増殖を示す点で他の変異体と際立った違いがあった。これらの変異体の変異部位は図 2 に示したように major hydrophilic あるいは effector 領域にあった。

#### D. 考察

本研究で HIV-1 Nef の MHC-I down-regulation 能は独立した機能であり、CTL によるウイルス感染細胞の障害の阻害に重要であることが実証された。また、HIV-1 Vif は産生細胞依存性ばかりでなく標的細胞依存性にも機能することが初めて証明された。

#### E. 結論

これまでの我々の研究で HIV-1 Nef や Vif の作用には細胞依存性があり、その作用点はウイルス複製の最終段階にあることが明らかとなった (図 3)。Nef や Vif のウイルス複製に及ぼす効果は逆転写過程以前にあらわれることも示された (図 3)。しかし、本研究で明らかにされたように、Nef や Vif の作用は単純でなく、さらに詳細な解析が必要である。Nef や Vif の機能の本態解明には丹念に変異体解析を進め結果を総合していくことが重要である。

#### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) Yoshida, A., Shimomoto, J., Koh, K.-B., Fujita, M., and **Adachi, A.** 2000. The H9/M8166 tropism of various HIV mutants is determined by distinct cellular factors. *International Journal of Molecular Medicine* 5:291-294.
- (2) Akari, H., Arold, S., Fukumori, T., Okazaki, T., Strebel, K., and **Adachi, A.** 2000. Nef-induced major histocompatibility complex class I down-regulation is functionally dissociated from its virion incorporation, enhancement of viral infectivity, and CD4 down-regulation. *Journal of Virology* 74:2907-2912.
- (3) Akari, H., Fukumori, T., and **Adachi, A.** 2000. Cell-dependent requirement of human immunodeficiency virus type 1 gp41 cytoplasmic tail for Env incorporation into virions. *Journal of Virology* 74:4891-4893.
- (4) Yoshida, A., Miyaura, M., Sakurai, A., Fukumori, T., Fujita, M., Akari, H., and **Adachi, A.** 2000. MHC-I expression in HTLV-1-positive and -negative cells. *International Journal of Molecular Medicine* 6:83-86.
- (5) Koyama, A.H., Arakawa, T., and **Adachi, A.** 2000. Characterization of apoptosis induced by sorbitol: a unique system for the detection of antiapoptotic activities of viruses. *Microbes and Infection* 2:599-606.
- (6) Hashinaka, K., Nishikata, I., Hashida, S., **Adachi, A.**, Oka, S., and Ishikawa, E.

2000. Preparations of recombinant HIV-1 p66 antigen to improve the specificity of immune complex transfer enzyme immunoassay of antibody IgG to HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 14:169-179.
- (7) Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Fujita, M., Koyama, A.H., and **Adachi, A.** 2000. Mutational analysis of HIV-1 Gag proteins. *International Journal of Molecular Medicine* 6:265-269.
- (8) Koh, K.-B., Fujita, M., and **Adachi, A.** 2000. Elimination of HIV-1 plasmid DNA from virus samples obtained from transfection by calcium-phosphate coprecipitation. *Journal of Virological Methods* 90:99-102.
- (9) Fukumori, T., Akari, H., Yoshida, A., Fujita, M., Koyama, A.H., Kagawa, S., and **Adachi, A.** 2000. Regulation of cell cycle and apoptosis by HIV-1 Vpr. *Microbes and Infection* 2:1011-1017.
- (10) Akari, H., Yoshida, A., Fukumori, T., and **Adachi, A.** 2000. Host cell-dependent replication of HIV-1 mutants with deletions in gp41 cytoplasmic tail region is independent of the function of Vif. *Microbes and Infection* 2:1019-1023.
- (11) Koyama, A.H., Fukumori, T., Fujita, M., Irie, H., and **Adachi, A.** 2000. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes and Infection* 2:1111-1117.
- (12) Hashinaka, K., Hashida, S., Nishikata, I., **Adachi, A.**, Oka, S., and Ishikawa, E. 2000. Recombinant p51 as antigen in an immune complex transfer enzyme immunoassay of immunoglobulin G antibody to human immunodeficiency virus type 1. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7:967-976.
- (13) Koh, K.-B., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Fujita, M., and **Adachi, A.** 2000. Cell-dependent *gag* mutants of HIV-1 are crucially defective at the stage of uncoating/reverse transcription in non-permissive cells. *Microbes and Infection* 2:1419-1423.
- (14) Isaka, Y., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Sugimoto, H., **Adachi, A.**, Hayami, M., Yoshie, O., Fujiwara, T., and Sato, A. 2000. Isolation and characterization of simian immunodeficiency virus variants that are resistant to nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Archives of Virology* 145:2481-2492.
- (15) Isaka, Y., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Sugimoto, H., **Adachi, A.**, Miura, T., Hayami, M., Yoshie, O., Fujiwara, T., and Sato, A. A single amino acid change at Leu-188 in the reverse transcriptase of HIV-2 and SIV renders them sensitive to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Archives of Virology*, in press

## 2. 学会発表

- (1) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、宮浦麻記、足立昭夫 (2000) HIV-1 Vif 変異体の機能解析. 第48回日本ウイルス学会学術集会、三重県津市.
- (2) 足立昭夫、宮浦麻記、吉田亜希子、櫻井明子、藤田美歌子 (2000) HIV-1 宿主

依存性 gag 変異体の複製欠損部位. 第 48 回日本ウイルス学会学術集会、三重県津市.

- (3) 藤田美歌子、櫻井明子、宮浦麻記、吉田亜希子、足立昭夫 (2000) HIV-1 Vif 変異体の機能解析. 第 14 回日本エイズ学会学術集会、京都.
- (4) 佐藤彰彦、三木 茂、杉本裕彦、藤原民雄、足立昭夫、速水正憲、義江 修 (2000) 逆転写酵素阻害剤耐性 SIVagm の分離. 第 14 回日本エイズ学会学術集会、京都.

#### 図の説明

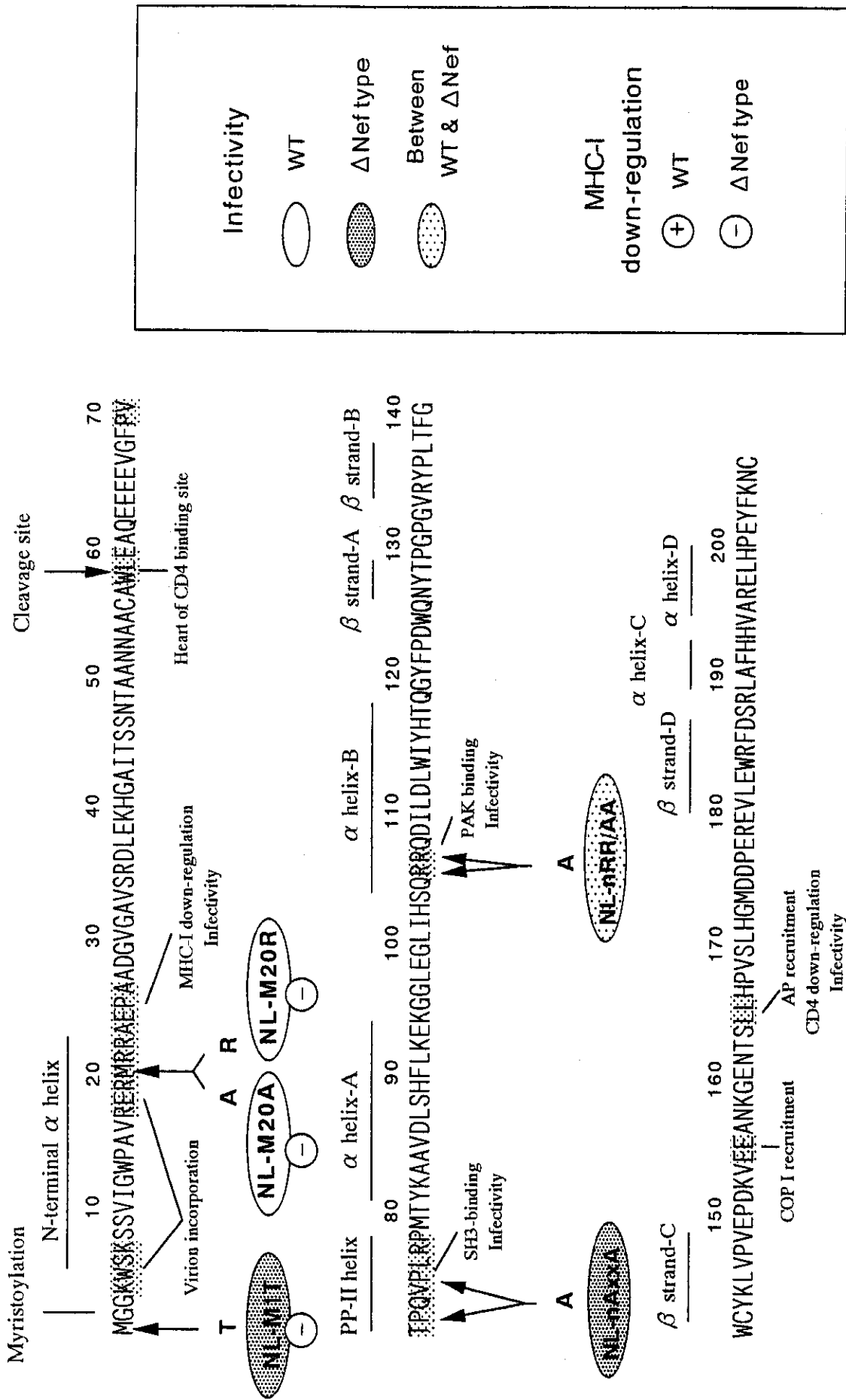
図 1 HIV-1 Nef の機能領域。報告されている HIV-1 Nef の構造と生物活性の相関を図示してある。我々の作製した 5 種の点変異体 (NL series) の変異部位、置換アミノ酸、生物活性(培養細胞での感染性と MHC-I down-regulation 能) を Nef 上に模式的に示した。培養細胞レベルでのウイルス感染価と MHC-I down-regulation 能に相関がないことを初めて証明し、Nef の感染個体内における重要性(免疫反応との関係)を強く示唆した。

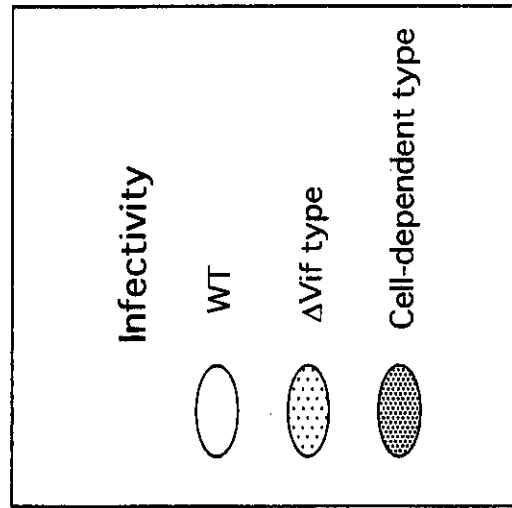
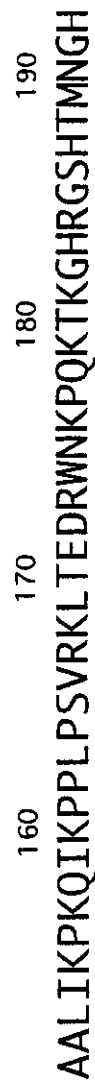
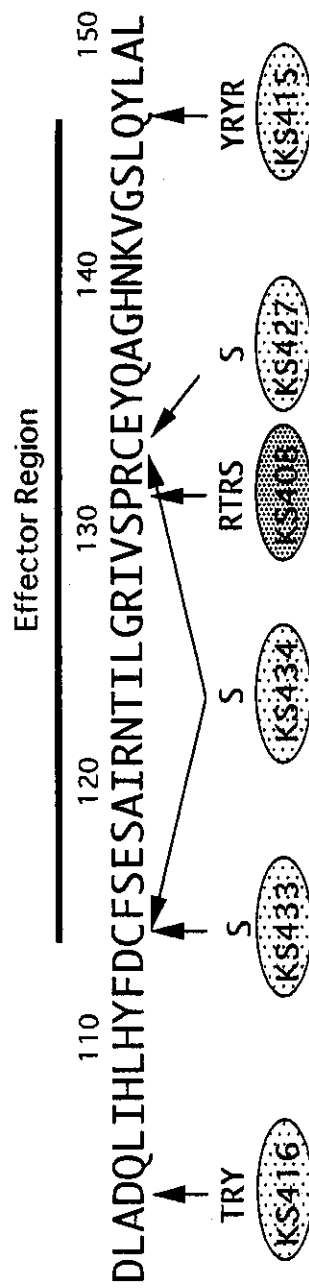
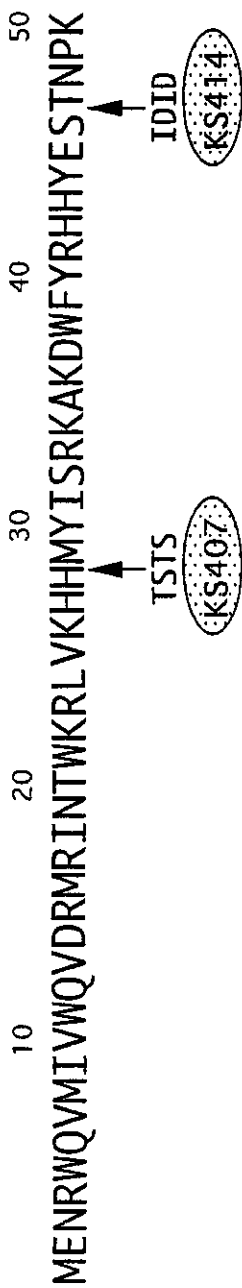
図 2 HIV-1 Vif の機能領域。僅かに報告されている HIV-1 Vif の機能領域上に我々の作製した 11 種の in-frame mutants (KS series) を示した。各変異ウイルスの培養細胞でのウイルス感染性を細胞特異性に従って分類した。今までにある報告では、Vif 変異体は producer cell-dependent に欠損を示すが ( $\Delta$  Vif type)、我々の KS400 及び KS408 変異体は標的細胞依存性にも挙動する新しいタイプのものであった。これら変

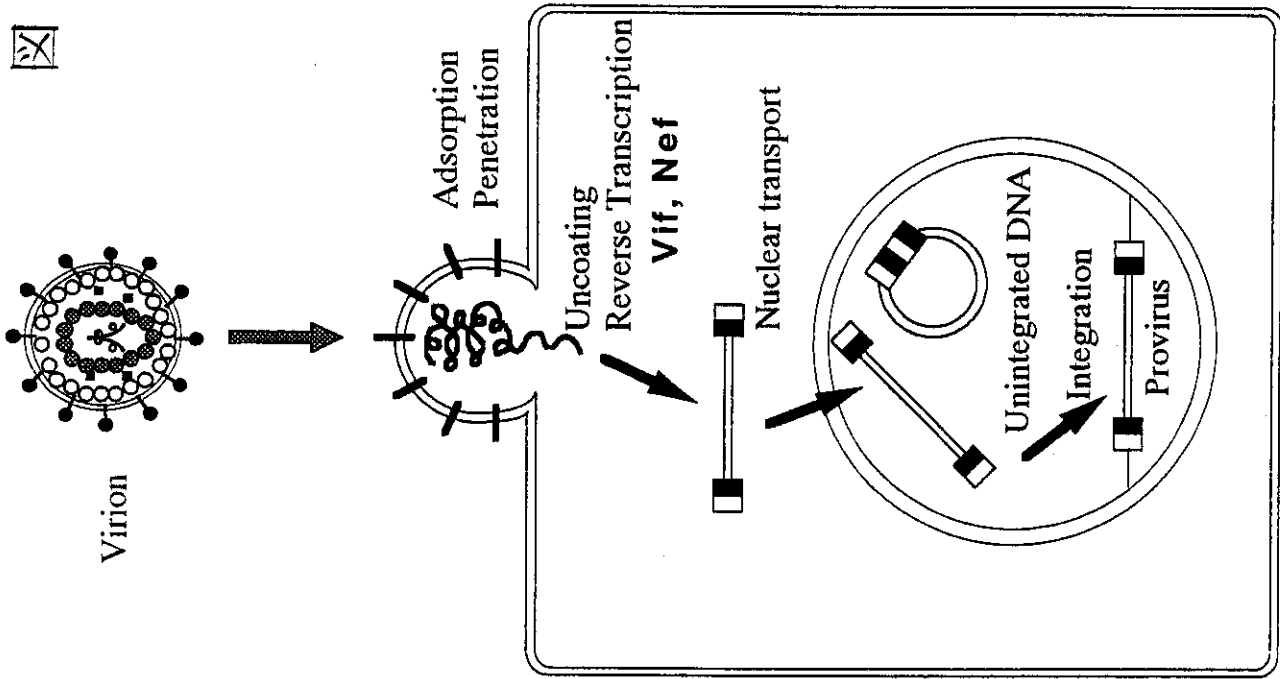
異体の変異導入部位は Vif の重要な領域にあり、KS400 及び KS408 は Vif の作用機構の解明に極めて有用であると予想される。

図 3 HIV-1 Vif 及び Nef のウイルス複製サイクルにおける作用点。Vif 及び Nef は複製サイクルの最終段階で働き、子孫ウイルス粒子を修飾する(図左)。その結果、ウイルス粒子が標的細胞に感染する際の脱殻/逆転写過程の効率が增强される(図右)。

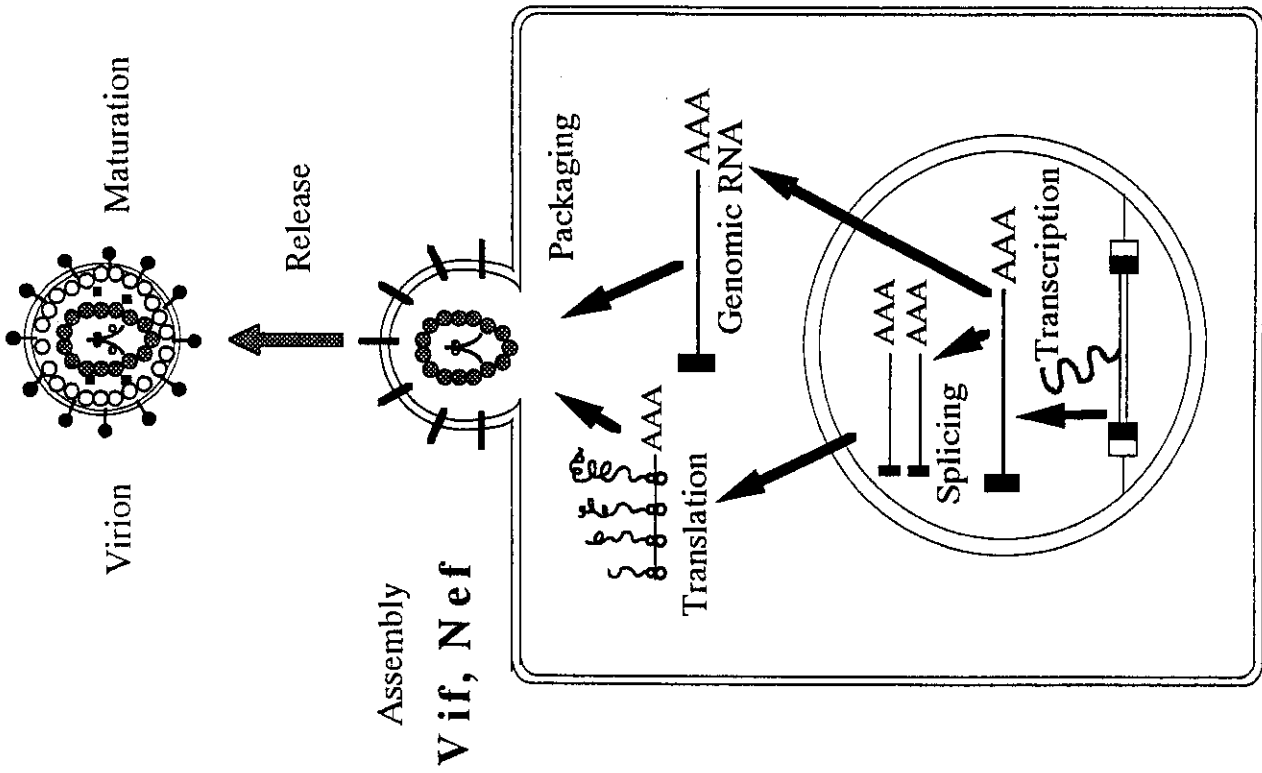








Early replication phase



Late replication phase

## CD4<sup>+</sup> T細胞サブセットの HIV-1 感受性と AIDS 病態に関する研究

**研究要旨** 本研究は、病態進行とともに末梢血に現れる幼弱な CD4<sup>+</sup> T細胞である CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> サブセットが T-tropic HIV-1 に高感受性を示すことを明らかにし、AIDS 病態進行に付随する M-tropic HIV-1 から T-tropic HIV-1 へのシフト、免疫系の Th1 から Th2 へのシフトに関する機序を説明し得る有用な系であることを示したものである。

分担研究者 生田和良 (大阪大学微生物病  
研究所・教授)

協力研究者 堀越東子、向井徹

### A. 研究目的

AIDS 病態進行にしたがって CD8<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> とともに CD4<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> T細胞の割合が上昇することが知られている。これは、感染に伴う免疫系の異常な活性化と考えられてきたが、その詳細なメカニズム、病態進行に与える影響については不明である。一方、患者個体内においては感染による T細胞減少を補うため細胞の活発な補給が起こっていると考えられ、よって未熟な細胞が多く存在すると予測できる。そこで、HIV-1 の標的細胞である CD4<sup>+</sup> T細胞上の CD38 発現が細胞の HIV-1 感受性に与える影響について検討するため、CD4<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> と CD4<sup>+</sup>/CD38<sup>-</sup> 分画のウイルス感受性について比較検討を行った。

### B. 研究方法

活性化マーカー CD25、HLA-DR と共に CD38 の末梢血 CD4<sup>+</sup> T細胞における陽性率をフローサイトメトリー解析により検討した。次に、CD38<sup>+</sup> と CD38<sup>-</sup> 分画の表面抗原を比較検討するため、両分画の HIV-1 レセプター (CD4)、コレセプター (CXCR4、CCR5) の発現をフローサイトメトリー法により解析した。また、それぞれの分画  $1 \times 10^6$  に対し、Ba-L (M-tropic HIV-1) または LAI (T-tropic HIV-1) 300 ng を 37°C、1 時間吸着させ、PHA、IL-2 存在下で 3 日間、さらに IL-2 存在下で 8~9 日間培養を行い、上清中のウイルス量 (抗原検出 ELISA) を定量した。また、両分画の培養上清中の IL-4、IFN- $\gamma$  の産生量を ELISA により解析し、これらサイトカインのウイルス産生に与える影響を検討した。

### C. 研究結果

末梢血 CD4<sup>+</sup> T細胞における陽性率は、CD25、HLA-DR が 1-3% であるのに対し CD38 は 61% であり、他の活性化マーカーとは陽性率が大きく異なることが確認され、さらに CD38 は CD4<sup>+</sup> T細胞を大きく 2 つの population にわけるマーカーであると考えられた。CD38<sup>+</sup> と CD38<sup>-</sup> 分画の表面抗原を比較した結果、CD4、CXCR4 発現に両分画で差は認めら

れなかったが、CCR5 陽性細胞の割合は CD38<sup>-</sup> 分画で高かった。さらに CD38<sup>-</sup> 分画は CD45RA、CD62L 高発現であり、未熟な細胞群であると考えられた。両分画のウイルス産生量を比較した結果、CCR5 発現の結果に一致して Ba-L 株は CD38<sup>-</sup> 細胞分画で顕著な増殖を示した。しかし、CXCR4 発現は両分画に差異が認められなかったにもかかわらず LAI 株は CD38<sup>+</sup> 細胞分画で顕著な増殖を示した。また、PHA 刺激の代わりに、PHA 刺激後の CD38<sup>-</sup> 分画の培養上清を添加したところ、CD38<sup>-</sup> 分画の培養上清を添加した場合に比べ、CD38<sup>+</sup> 分画における LAI 産生は有意に亢進した。そこで、PHA 刺激後の両分画のサイトカイン産生量を比較検討したところ、CD38<sup>+</sup> 分画は Th2 サイトカインである IL-4 の産生能が高く、逆に CD38<sup>-</sup> 分画は Th1 サイトカインである IFN- $\gamma$  産生能が高かった。実際、IL-4 添加により CD38<sup>-</sup> 分画の T-tropic HIV-1 産生が促進された。

### D. 考察

幼弱な CD4<sup>+</sup> T サブセットと考えられる CD4<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> 分画は T-tropic HIV-1 に高感受性であり、その機序として、本文画の産生する Th2 サイトカインがウイルス産生亢進に関わっていると考えられた。今回の解析により、病態進行に伴う Th1 から Th2 へのシフト、HIV-1 トロピズムの M-tropic から T-cell tropic へのシフトに CD4<sup>+</sup>/CD38<sup>+</sup> 分画が関与していることが示唆された。

### E. 結論

HIV-1 の標的である CD4<sup>+</sup> T細胞のうち、CD38<sup>+</sup> のサブセットは tropic HIV-1 に高感受性であり、CD38<sup>-</sup> のサブセットは M-tropic HIV-1 に高感受性であった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Zheng, Y.-H., Sentsui, H., Sugita, M., Nakaya, T., Kishi, M., Hagiwara, K., Inoshima, Y., Ishihara, C., Kono, Y., Lu, J.-L., and Ikuta, K.: Replication Ability in vitro and in vivo of equine infectious anemia virus avirulent Japanese strain. *Virology* 266, 129-139, 2000.

Suzuki, S., Tobiume, M., Kameoka, M., Sato, K.,