

- Takahashi, T. A., 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<sup>+</sup> as well as CD8<sup>+</sup> T cells. *Microbiol. Immunol.* 44, 111-121, 2000.
- Auwanit, W., Ayuthaya, P.I.N., Mukai, T., Kurata, T., and Ikuta, K.: Highly variable sequences at env V3 region of HIV-1 distributing among Thai carriers during 1995 to 1997. *AIDS Res. Human Retroviruses* 16, 283-289, 2000.
- Bahmani, M. K., Kameoka, M., Goto, T., Sano, K., Luftig, R. B., and Ikuta, K.: Fusion of uninfected T-cells occurs with immature HIV-1 protease-mutant, but not morphologically similar protease inhibitor derived particles. *Virus Res.* 66, 131-137, 2000.
- Zheng, Y.-H., Sentsui, H., Kono, Y., and Ikuta, K.: Mutations occurring during serial passage of Japanese equine infectious anemia virus in primary horse macrophages. *Virus Res.* 68, 93-98, 2000.
- Ikuta, K., Suzuki, S., Horikoshi, H., Mukai, T. and Luftig, R. B.: Positive and negative aspects of the human immunodeficiency virus protease: Development of inhibitors versus its role in AIDS pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews (MMBR)* 64, 725-745, 2000.
- Horikoshi, H., Kinomoto, M., Sasao, F., Mukai, T., Luftig, R. B. and Ikuta, K.: Differential susceptibility of resting CD4<sup>+</sup> lymphocytes to a T-tropic and a macrophage (M)-tropic human immunodeficiency virus type 1 is associated with their surface expression of CD38 molecules. *Virus Res.* 73, 1-16, 2001.
- Komoto, S., Kinomoto, M., Ibrahim, M. S., Zhong, Q., Wattana, A., Ayuthaya, P. I. N., Otake, T., Mori, H., Oishi, I., Kurosu, T., Takahashi, H., Mukai, T., and Ikuta, K.: Low or no antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 Nef in infected carriers with subtype E, in contrast to subtype B that showed antibodies preferentially recognizing subtype-specific Nef epitopes. *Vaccine*, in press.
- Auwanit, Q., Mukai, T., Ayuthaya, P.I.N., Kurata, T., and Ikuta, K.: Full-length sequences of two subtype E HIV-1 isolates from 1995 samples of patients with sexually transmitted diseases in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press.
- Kurosu, T., Mukai, T., Auwanit, W., Ayuthaya, P.I.N., Ikuta, K.: Variable sequences in the long terminal repeat and its downstream region of some of HIV-1 subtype E recently distributing among Thai carriers. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, in press.
2. 学会発表
- Mukai, T., Auwanit, W., Kurosu, T. and Ikuta, K.: Full-length sequence and construction of infectious DNA clone of human immunodeficiency virus type 1 subtype A/E. 5<sup>th</sup> Asia Pacific Congress of Medical Virology, Bali, Indonesia, June, 2000.
- 向井徹、黒須剛、白神未来、河本聡志、木ノ本正信、堀越東子、生田和良. HIV-1 分子クローン群の調整. ウイルス学会, 2000.
- 黒須剛、向井徹、河本聡志、木ノ本正信、生田和良. HIV-1, サブタイプ, 複製, パッケージング. HIV-1 タイ E 型 5' LTR,  $\psi$  領域の塩基配列の特徴と、その機能解析. ウイルス学会, 2000.
- 河本聡志、木ノ本正信、向井徹、小林剛、黒須剛、大竹徹、生田和良. タイ E 型 HIV-1 分離株のアポートシス誘導能. ウイルス学会, 2000.
- 堀越東子、木ノ本正信、笹尾芙蓉子、向井徹、生田和良. CD4<sup>+</sup>細胞サブセット間の HIV-1 感受性に関する比較解析. ウイルス学会, 2000.
- 木ノ本正信、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. エイズ学会, 2000.
- 向井徹、白神未来、黒須剛、河本聡志、木ノ本正信、生田和良. HIV-1 感染性 DNA からのウイルスクローニング. エイズ学会, 2000.
- 黒須剛、生田和良. HIV-1 サブタイプ B、A/E、C の Tat 活性の比較. エイズ学会, 2000.

## HIV-1 Tat による MHC class II 発現抑制作用と免疫不全

分担研究者 岡本 尚 名古屋市立大学医学部分子医学研究所分子遺伝学教授

研究要旨 AIDS とならんで重症免疫不全を起こす疾患として bare lymphocyte syndrome (BLS)がある。BLS は class II MHC 遺伝子の転写制御因子 class II transactivator (CIITA)の遺伝子レベルの変異で起こる遺伝性疾患である。我々は本研究において、HIV 感染特にそのトランス活性化因子である Tat が MHC II 遺伝子の発現を抑制することを見出した。cyclin T1 は CDK9 とともに P-TEFb を形成し、Tat および CIITA による転写レベルでの遺伝子発現を増強することが判っているが、Tat は cyclin T1 の CIITA 結合部位に結合することによって CIITA の作用を抑えた。これらの事実より、マクロファージなどへの抗原提示細胞への HIV 感染に伴う Tat の作用は CIITA の作用抑制を通して免疫不全の病態形成に積極的に関与する可能性が示唆された。従って、Tat 作用の抑制および CIITA の活性化は、ウイルス増殖の抑制のみならず免疫不全状態の改善にもつながるものと考えられた。

### A. 研究目的

HIV-1 感染に伴って class II MHC (MHC II)の発現が減少することは、すでに Polyakら(J. Immunol. 159: 2177-2188, 1997)により報告されている。他方、BLS は MHC II 遺伝子の発現が先天的に減少している重症免疫不全症候群であり、その原因遺伝子検索の結果、MHC II 遺伝子発現に関わる転写因子 (RFX) および CIITA に遺伝子変異が見出された。CIITA は MHC II のプロモーター領域には結合しないが、DNA 結合蛋白である RFX と結合し、また基本転写因子や CBP などのコアクチベーターに結合し、MHC II 遺伝子転写の活性化に必要な不可欠な転写活性化因子である。さらに、 $\gamma$ インターフェロンによる MHC II の発現誘導には CIITA によることが示されている。このような事実から、CIITA は MHC II の関わる免疫応答とりわけ抗原提示のマスタースイッチと考えられる。

他方、HIV のトランス活性化因子である Tat は、ウイルス mRNA の 5'リーダー配列に存在する TAR RNA 構造に結合し、その作用を発揮する。Tat がウイルス mRNA 転写伸長反応を促進する際に必要な因子として cyclin T1 と CDK9 が必要であり、両者は P-TEFb (positive transcription elongation factor b)を構成する事、などが明らかになっている。すなわち、Tat が TAR と結合する際に、cyclin T1 が加わる事によってその結合が安定化し、さらに RNA polymerase II の CTD 領域のリン酸化が CDK9(P-TEFb)によ

って引き起こされ、転写の伸長が促進されると考えられる。興味深いことに、cyclin T1 は CIITA の作用に必須の因子としても知られている。このことから、cyclin T1 を巡り Tat と CIITA との間に機能的な競合が起こることが予測される。

そこで、本研究では、Tat が MHC II 遺伝子群の転写抑制を実際に引き起こすか、またその際に Tat がいかなるメカニズムで関わっているかを明らかにする事を目的とし実験を行った。

### B. 研究方法

(1)細胞およびウイルス：293T, THP1, および Tat を構成的に発現する THP1/Tat 細胞をおを用いた。HIV-1 full-length proviral DNA を含むプラスミッドとしては pNL4-3 と pHXB2 を用いた。細胞からのウイルス産生量は、培養細胞上清中のウイルス p24 抗原量を p24 antigen capture ELISA assay (RetroTek 社)により定量した。

(2)細胞表面 MHC 抗原の測定：細胞表面での MHC II (HLA-DR, HLA-DP) および MHC I (HLA-A, -B, -C) の発現は FACS によって解析した。

(3)CAT 検定：種々の CAT 発現プラスミッドとエフェクタープラスミッドの COS 細胞への導入には lipofectamine を用いた。24 時間後、細胞から蛋白を抽出し、CAT 活性を測定した。

(3) Northern blot 解析: MHC class II 遺伝子の発現は細胞より total RNA を抽出し、Northern blot 法により HLA-DR $\alpha$  cDNA とコントロールとして G3PDH cDNA をプローブに用いて実施した。蛋白間相互作用をみるために、GST<sup>+</sup> cyclin T1 融合蛋白を GSH ビーズに結合させ、in vitro 転写・翻訳系で合成した 35S-標識した CIITA 蛋白やその変異体もしくは Tat 蛋白とさらに反応させた。洗浄後に、cyclin T1 結合蛋白を SDS-PAGE で同定した。

### C. 研究成果

ヒト単球系細胞株 THP-1 に HIV-1 Tat を構成的に発現させた細胞株 THP1/Tat を作成し、細胞表面の MHC 抗原を FACS を用いて解析した。Fig. 1A に示すように、親株細胞 THP1 では MHC I および II は interferon  $\gamma$  により効率よく誘導されるが、Tat 発現細胞 THP1/Tat では MHC II の発現誘導が顕著に低下していた。MHC class I の発現量については両者で差を認めなかった。また、Northern blot hybridization の実験から、この効果が mRNA レベルでも確認できた。

そこで、この interferon  $\gamma$  による MHC II 発現誘導の阻害が Tat によってどのように引き起こされているかを調べるために、以下の一連の実験を行った。この結果を Fig. 2 に示す。まず、Tat が CIITA による MHC II プロモーター(DRA)活性を抑えるか否かを調べた (Fig. 2B)。CIITA 発現プラスミッドにより DRA プロモーター活性はおよそ 20 倍に上昇した。ところが、Tat 発現ベクターをさらに導入する事により、DRA プロモーターからの遺伝子発現は Tat の量に依存して顕著に抑制された。Tat 活性に必須な 30 番目のシステインをグリシンに置換した Tat 変異体ではこのような効果は見られなかった (data not shown)。

次に、この効果が転写のコアクチベータのどの分子によって引き起こされるかを調べた (Fig. 2C, D)。Tat による MHC II プロモーターの抑制は、p300 および CBP などの通常の転写コアクチベーターを過剰発現しても回復せず、興味深いことに cyclin T1 を過剰発現させることによって回復した。また、CIITA が結合するか否かを in vitro pull-down assay で調べた実験からも cyclin T1 の活性化ドメイン(AD)およびプロリン・セリン・スレオニンに富んだ領域 (P/S/T) で CIITA と

結合する事が明らかになった。また、CIITA と GST cyclin T1 の結合は過剰量の Tat により著しく抑制されることが明らかとなった (data not shown; see Kanazawa et al., 2000)。

以上より、Tat による MHC II 転写の抑制は MHC II のトランスアクチベーターと Tat との間で、共通の因子である cyclin T1 を競合する事によって起こることが示唆された。そこで、Fig. 3 の実験では、この競合が逆方向に起こるか否かを実際の実験により確認した。HIV-1 LTR からの転写は Tat によりほぼ 80 倍に活性化されたが、CIITA の過剰発現により著しく抑制された (Fig. 3A)。さらに、Fig. 3B の実験で HIV-1 ウイルス増殖に対する CIITA 過剰発現の効果を見たところ、トランスフェクションにより細胞内に導入した 2 種類の HIV-1 full-length クローンからのウイルス増殖は CIITA の過剰発現によって著明に抑制された。

### D. 考察

今回の一連の実験から、Tat は MHC II 遺伝子の発現に主要な役割を持つ転写活性化因子 CIITA と cyclin T1 を競合することによって MHC II 遺伝子群の発現を抑制することが明らかとなった。このことは、MHC II が抗原提示に必須の役割を持つことと考え合わせると、HIV の抗原提示細胞への感染もまた、免疫不全症の病態の一部を構成する事が示唆される。実際、HIV 感染者では新たな抗原に対する免疫応答が十分に誘導されないことは従来より知られており、今回の結果はその分子的理解を促進するものと思われる。さらに、逆の実験として、CIITA を過剰発現させたところ、Tat による HIV-1 LTR からのウイルス遺伝子発現の抑制が起こり、実際にウイルス複製が抑制されることが明らかになった。これらの事実から、ウイルス増殖と免疫不全の病態進行には Tat が重要な作用をしているとともに、CIITA の過剰発現もしくは活性誘導によりこれらの病態の逆行が可能であることが示された。実際に、HIV-1 感染者の血清中の  $\gamma$ IFN の濃度とウイルス負荷量が逆相関し、長期未発症例では  $\gamma$ IFN 濃度の高い患者が多い (Bailer et al., J. Immunol. 162: 7534-7542, 1999) ことからこれらの可能性が裏付けられる。

## E. 結 論

Tat は抗原提示細胞での抗原提示に関わる MHC II 遺伝子の免疫応答に伴う発現誘導を阻止する事によって先天性の重症免疫不全症のひとつである bare lymphocyte syndrome (BLS)と同様の状態を引き起こすことが今回の研究により明らかにされた。すでに、従来の研究から HIV のコードする Nef が MHC I の細胞表面への発現を膜レベルで downregulate することが分かっているが、今回の結果とあわせて考察すると、HIV のコードする制御蛋白は単にウイルスの増殖の制御を担うだけではなく、宿主細胞蛋白と相互作用する事によって、結果的に AIDS における免疫不全の病態に関わっていることが明らかになった。また、 $\gamma$ IFN などにより CIITA の活性化を促進することにより HIV 感染に伴う AIDS の発症を遅らせる、もしくは病態を逆行させて治癒に向かわせることが可能なことが、少なくとも今回の研究結果から理論的に示唆された。

## F. 研究発表 (論文発表)

Okamoto, H., Asamitsu, K., Nishimura, H., Kamatani, N., Okamoto, T.: Reciprocal modulation of transcriptional activities between HIV-1 Tat and MHC class II transactivator CII TA. B.B.R.C. 279:494-499, 2000.

Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Itoh, M., and Okamoto, T.: Involvement of TLS/FUS in the NF- $\kappa$ B p65-Mediated Transactivation. J. Biol. Chem. (in press)

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.

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.

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.

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 fluoroquinolone derivative K-37. Virology 272:402-408, 2000.

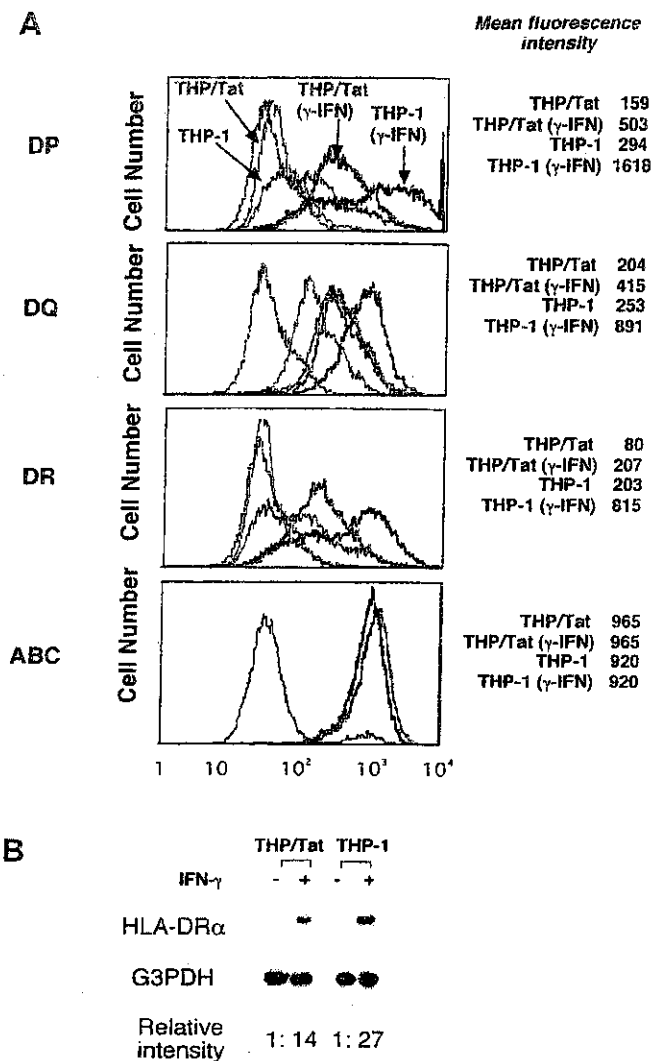
Kanazawa, S., Okamoto, T., Matija Peterlin, B.: Tat competes with CII TA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. Immunity 12:61-70, 2000.

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.

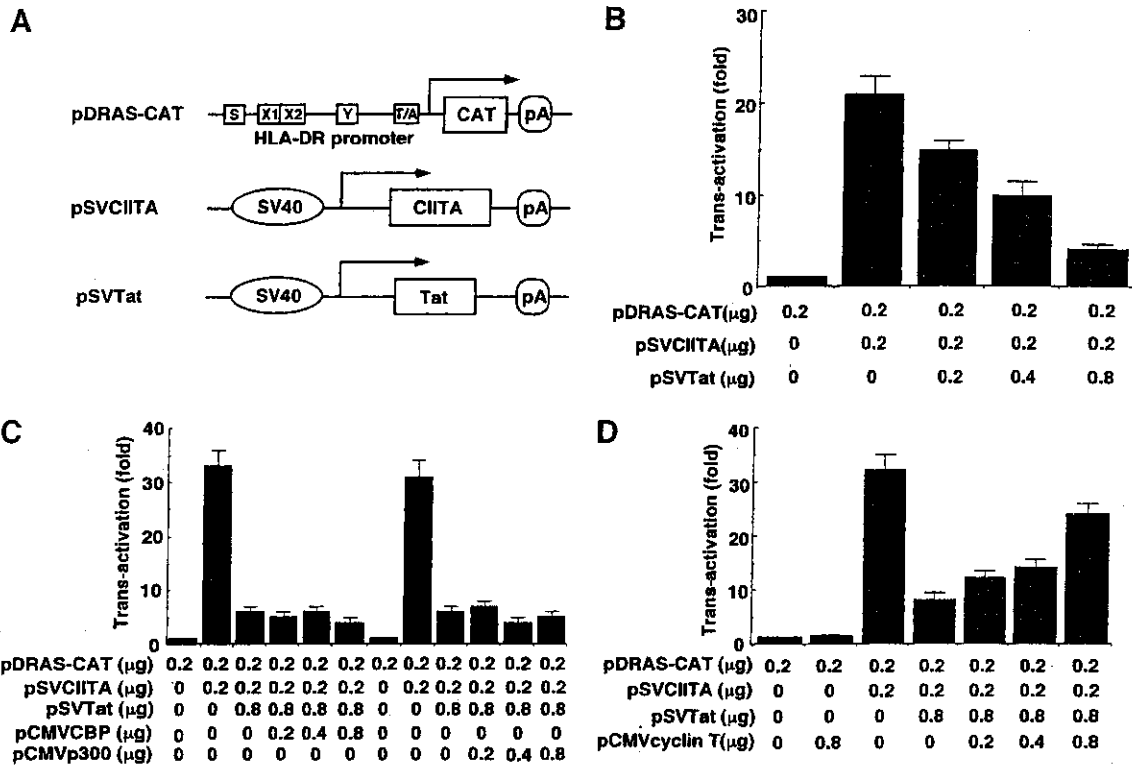
Kobayashi, K., Matsumoto, S., Morishima, T., Kawabe, T. and Okamoto, T.: Prevention of cancer metastasis by cimetidine through blocking the expression of E-selectin on endothelial cells. Cancer Res. 60:3978-3984, 2000.

## G. 知的所有権の取得状況

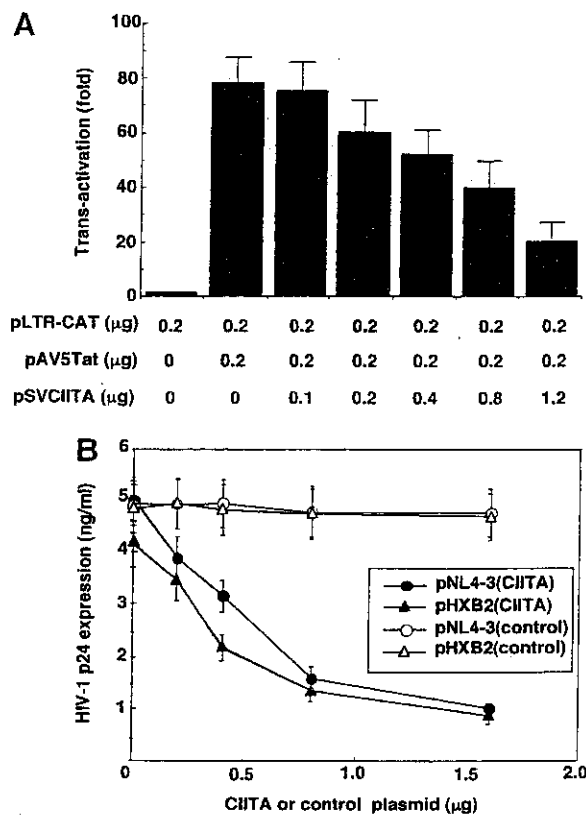
なし



**FIG. 1.** Tat blocks the expression of MHC II molecules. (A) Inhibition of cell surface expression of MHC II molecules on THP-1 cells by Tat. Cell surface expression of MHC II molecules (DP, DQ, and DR) and MHC class I molecule (ABC) on THP-1 cells and THP/Tat cells stably expressing HIV-1 Tat protein (32) were analyzed by flow cytometry. After stimulation by human IFN- $\gamma$  (1000 U/ml), the cells were harvested and stained with anti-human HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, or HLA-ABC antibodies conjugated with FITC and cell surface expression of these molecules were analyzed by flow cytometry (FACSvantage). The mean fluorescence intensity value for each culture is indicated. Thin red line, THP/Tat (control); thick red line, THP/Tat with IFN- $\gamma$  treatment; thin blue line, THP-1 (control); thick blue line, THP-1 with IFN- $\gamma$  treatment; black line, autofluorescence. (B) Inhibition of MHC II gene (HLA-DR $\alpha$ ) by HIV-1 Tat. THP-1 and THP/Tat cells, in the presence or absence of IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) were analyzed for the HLA-DR $\alpha$  mRNA expression by Northern blot hybridization using human HLA-DR $\alpha$  cDNA as a probe. Expression of G3PDH was presented as a control.



**FIG. 2.** Tat blocks the CIITA-mediated transactivation from a MHC II (DRA) promoter and this inhibition is restored by Cyclin T1 but not by CBP nor p300. (A) Schematic representations of HLA-DR promoter and plasmids used in this study. Y, NFY-binding site; X1 and X2, RFX-binding sites; S, S box; SV40: SV40 promoter, pA: poly A. (B) Inhibition of the CIITA-mediated transactivation of DR promoter by Tat. 293T cells were transfected with the plasmids as indicated, harvested after 48 h of transfection, and CAT assays were performed. Experiments were performed in triplicates and the results were represented by the mean value and the standard deviation. (C) 293T cells were transfected with pDRASCAT reporter plasmid and effector plasmids (pSVCIIITA, pSVTat, pRSVCBP, pCMVp300) as indicated. After 48 h of transfection, cells were harvested and CAT assays were performed as shown. (D) 293T cells were transfected with pDRASCAT reporter plasmid and effector plasmids (pSVCIIITA, pSVTat, pCMVcyclin T) as indicated. Note that the restoration of the CIITA-mediated transactivation from the DR promoter is in a dose-dependent manner for the amount of pCMVcyclinT plasmid.



**FIG. 3.** Inhibition of Tat-mediated HIV-1-transactivation and HIV-1 replication by CIITA overexpression. (A) Inhibition of the Tat transactivation of HIV-1 promoter by CIITA. 293T cells were transfected with the plasmids as indicated. CAT assays were performed after 48 h of transfection. (B) Overexpression of CIITA blocks HIV-1 replication. 293T cells were transfected with 0.5 µg of HIV-1 molecular clones (pNL4-3 or pHXB2) together with various concentrations of the plasmid coding for CIITA (pSVCIIITA) or empty plasmid (control). After transfection, the cells were incubated for 48 h. The culture supernatants were analyzed for the determination of p24 antigen level by p24 antigen capture ELISA assay using a commercial kit (RETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISA kit, Cellular Products Inc.). Open circles, HIV-1 (pNL4-3) virus production; closed circles, HIV-1 (pNL4-3) virus production in the presence of CIITA; open triangles, HIV-1 (pHXB2); closed triangles, HIV-1 (pHXB2) in the presence of CIITA.

マクロファージにおけるHIVの複製効率に関する研究

研究要旨：マクロファージはCD4, CXCR4, CCR5陽性であるにも拘らず、R5 HIVのみが感染・増殖し、X4 HIVは侵入するがほとんど複製しない。本研究では、マクロファージ感染性に重要なEnvV3領域のアミノ酸変化を伴わないサイレント変異ウイルスをM-tropic JRFLで作製し、変異ウイルスは、①野生株と同様にCCR5をco-receptorに使用して侵入する、しかし、②マクロファージにおける複製効率が顕著に低下したX4タイプウイルスに変換され得る、ことを示した。これにより、V3領域の塩基配列自体がHIV restrictionの重要な因子の1つであることを明らかにした。

分担研究者 小島 朝人  
国立感染症研究所  
感染病理部・室長  
共同研究者 原田 貴之  
国立感染症研究所  
感染病理部・協力研究員

ーンを293T細胞にトランスフェクションして調整した。Co-receptor usageの検討：野生型及びV3-サイレント変異JRFLウイルスをCD4, CCR5, CXCR4陽性MAGI5細胞或いはCCR5陰性のMAGI細胞に感染させ、上清中のウイルスをp24 ELISAで、ウイルス感染細胞をMAGIアッセイで測定した。マクロファージ感染性の検討：マクロファージはヒトPBMCから付着性細胞を調整し、M-CSF存在下で1週間分化させたものを用いた。野生株及び変異株ウイルスを感染させ、上清中のp24量を同様に測定した。また、感染マクロファージを18日間培養後固定・染色し、巨細胞形成を観察した。

A. 研究目的

HIVの生体内リザーバーになっているマクロファージはCD4, CXCR4, CCR5陽性である。しかし、R5 HIV(M-tropic)のみが感染・増殖し、X4 HIV(T-tropic)は細胞内に侵入するがほとんど複製しない(restriction)。両者のEnvV3領域を交換するとR5ウイルスはマクロファージ感染性を失い、X4ウイルスは感染性を獲得する。このことはマクロファージ感染性を支配する主な要因がV3領域にある事を示すものの、X4ウイルスがマクロファージに侵入しても複製できない謎は不明のままである。また、co-receptor usage/entryでは説明できない分離株も最近報告され、謎が深まっている。本研究では、HIV tropism/ restrictionにV3塩基配列自体が影響する可能性を検討し、この謎の解明を目指した。

B. 研究方法

V3-サイレント変異HIVの構築：M-tropic, R5ウイルスであるJRFL感染性DNAクローンのV3領域にサイレント変異を導入して、アミノ酸配列を変化させずに塩基配列のみを変えた変異JRFLクローンを作製した。ウイルスはDNAクロ

(倫理面への配慮)

血液採取は研究の趣旨・内容を提供者に説明して、本人の理解と承諾のもとに実施した。

C. 研究結果

HIVクローンJRFL株のV3領域GPGRチップの上流、直下流、及び遠下流部位にサイレント変異を導入して変異クローンJM1, JM2, JM3を作製した。これらDNAクローンをトランスフェクトした293T細胞の培養上清より超遠心で調整したビリオンをウエスタンブロット法で解析した。その結果、Env糖蛋白gp120をはじめGag, Polなど他のウイルス蛋白についても、サイレント変異ビリオンを構成している蛋白は、量的にも質的にも野生株と全く同様であった。

そこで、変異ウイルスをCD4, CCR5, CXCR4陽性



のMAGIC5細胞に感染させたところ、何れの変異株感染細胞からも野生株と同等量のp24が放出された。また、変異ウイルス感染MAGIC5細胞をX-Galで染色した場合でも、野生株とほぼ同数の青フォーカスが観察された。しかし、CD4, CXCR4陽性・CCR5陰性のMAGI細胞に感染させた場合には、JRFL野生株においても変異株においても、上清中のp24及びMAGIアッセイによる青フォーカスは検出されなかった。

次に、PBMC付着細胞からM-CSFで分化させたマクロファージへの感染実験を行った。その結果、3種の変異ウイルスJM1, JM2, JM3のうちJM1ではM-tropic JRFL野生株と同等のp24量が培養上清中に放出されていた。これに対して、他の2種の変異株JM2, JM3ではp24の産生が著しく低下していた。この結果と一致して、感染マクロファージの長期間培養で形成される巨細胞は、野生株とJM1変異株で観察され、JM2とJM3変異株では観察されなかった。

#### D. 考察

本実験で作製したV3サイレント変異ウイルスはアミノ酸の置換を伴わないため、ビリオン構成ウイルス蛋白は野生株と同等であった。従って、Env蛋白のCD4結合構造・V3領域のCCR5 co-receptor結合構造は、当然ながら野生株と同一であることが予想された。事実、変異ウイルスは、M-tropicのR5ウイルスであるJRFL野生株と全く同様にCD4/CCR5陽性細胞に感染し、CD4陽性CCR5陰性細胞には感染しなかった。即ち、ウイルス侵入のco-receptor usageも不変であった。しかし、CD4, CCR5, CXCR4を表面に持つ初代培養マクロファージに対して、変異ウイルスは旺盛に複製するR5野生株タイプと、複製がrestrictされるX4株タイプの2種に分かれた。両タイプで異なる点はV3領域の塩基配列のみである。従って、マクロファージにおけるウイルス複製を規定しているrestriction因子の1つはV3領域の塩基配列であることが本研究から明らかになった。また、X4タイプに変換された変異株に共通する変異導入部位はGPGRチップの直下流部位であることから、この部位の塩基配列の重要性も示唆された。

#### E. 結論

マクロファージ感染性に重要なEnvV3領域にアミノ酸変化を伴わないサイレント変異を導入したM-tropic JRFLの変異ウイルスでは、①野生株と同様にCCR5をco-receptorに使用して侵入する。にも拘らず、②マクロファージにおける複製効率・巨細胞形成能が顕著に低下するウイルスに変換された。この結果から、V3領域の塩基配列自体がHIV restrictionの重要な因子であることが明らかになった。

#### F. 健康危険情報

該当事項無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).

##### 2. 学会発表

- 1) 原田貴之、横田恭子、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人: HIV-1エンベロープV3領域の遺伝子としての重要性。第14回日本エイズ学会学術集会、2000年11月、京都。
- 2) 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総会、2000年10月、三重。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項無し。

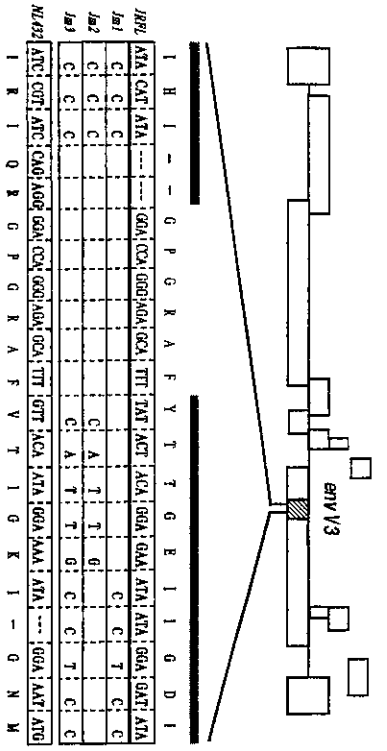


図1. JRFLのV3領域の内、NL432とアミノ酸またはヌクレオチド配列の異なる部位（上部斜線ノド）に変異をsilentに導入した。各ヌクレオチドは変異をsilentに導入したため、そのヌクレオチド配列は変わっていない。このことによりV3領域の遺伝子の影響のみを見ることが出来る。

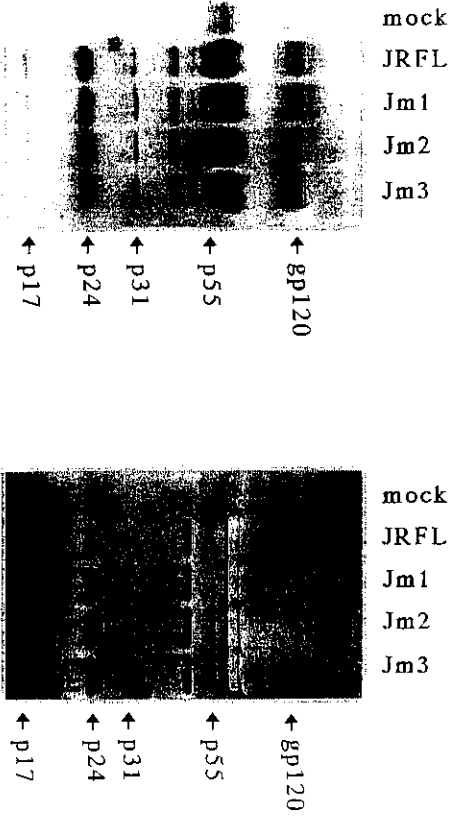


図2. 複製、発現させたヌクレオチドを想違心にて沈殿後、ウェスタンブロットで解析を行った。エンペローV3領域へのsilent mutation導入はgp120等のウイルス蛋白質の取り込みに影響を与えなかった。(左) BioRad 抗HIV-1強陽性抗体 (右) HIV-1患者血清

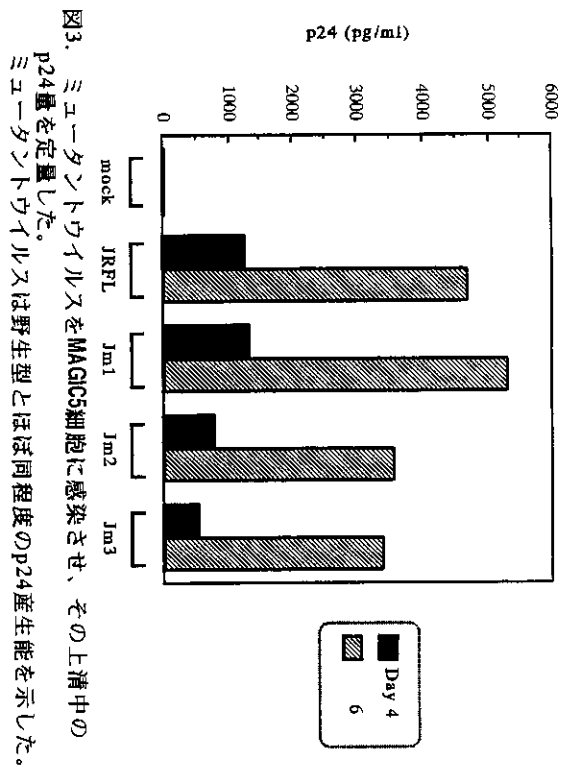


図3. ニュータクトウイルスをMAGIC5細胞に感染させ、その上清中のp24量を定量した。ニュータクトウイルスは野生型とほぼ同程度のp24産生能を示した。

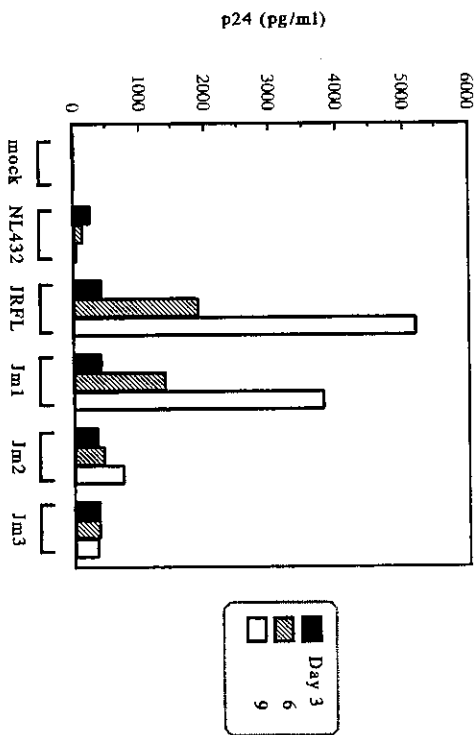


図5. ニュータクトウイルスをワクロフラーに感染させ、その上清中のp24量を定量した。ワクロフラーはモノサイトを人末梢血からdish法を用いて分離し、M-CSF, human serum存在下、一週間分化させたものを用いた。ニュータクトウイルスJm1は野生型とほぼ同程度のp24産生能を示したがJm2, Jm3においてはそのp24産生能は低下していた。

# HIV-1 subtype E (CRF01\_\_A/E) 分子クローンの樹立と応用

分担研究者氏名： 佐藤 裕徳

(研究要旨) HIV-1 subtype E のウイルス学研究を行う上で基本材料となる感染性分子クローンの樹立を試みた。λ phage vector を用い、HIV-1 subtype E X4/R5 株 NH1 の proviral DNA 全長 (9721 bp) をクローニングした。この分子クローン (p93JP-NH1) は、PHA-PBMC, Macrophage での複製能は微弱もしくは検出限界以下であった。一方、ヒト transformed cell lines (CD4<sup>+</sup> T-cell-lines および CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> or CXCR4<sup>+</sup> adherent cells) では高い複製能を有した。p93JP-NH1 とその感受性細胞を用い、*in vivo* で subtype E RT に生じた 11 アミノ酸挿入変異の役割を解析した。その結果、この変異には、複数の点変異と協調してウイルスに多剤耐性を付与する働きがあることが判明した。

## A. 研究目的

現在 HIV-1 subtype E 遺伝子配列の特徴とタンパク質の機能あるいはウイルス形質との対応関係は、欧米流行株 subtype B の情報を基に類推されているに過ぎない。主な理由として、感染性分子クローンの欠如が挙げられる。

本研究では、subtype E のウイルス学研究を行う上で基本材料となる感染性分子クローンの樹立を試みた。さらに、得られたクローンを用い、HAART 治療を受けた subtype E 感染者の逆転写酵素 (RT) に見い出された 11 アミノ酸挿入変異の役割を詳細に検討した。

## B. 研究方法

(1) HIV-1 subtype E full-length 分子クローン p93JP-NH1 の作製 (図 1)

MT2 細胞に薬剤感受性 subtype E X4/R5 株 93JP-NH1 を感染させ、感染ピ

ーク 1 日前に細胞から unintegrated circular proviral DNA を Hirt 法により抽出した。サザンブロット解析により、93JP-NH1 株 proviral DNA の single restriction enzyme site (SpeI) を同定した。Hirt DNA を SpeI で切断の後、9-12kb DNA をサイズ分画し、λ phage vector (ZAP Express) の SpeI-digested arms と ligaton し、Gigapack III Gold packaging extract (Stratagege) を用いファージライブラリーを作製した。このライブラリーより NH1 gag および env 領域 DNA をプローブとしたプラークハイブリダイゼーションで HIV-1 DNA 陽性クローンを選別した (6 positive clones out of  $7.5 \times 10^5$  plaques)。陽性クローンから *in vivo excision* により 1-LTR proviral genome を含む phagemid を作製した。

得られた phagemid を SpeI 消化し、ligation することにより、2-LTR linear proviral DNA を含む concatemers を作製した。これを HeLa 細胞に FuGENE 6 を用いて導入してウイルス粒子を作製し、

MAGIC-5 を用いた *de novo* infection に用いた。その結果、MAGIC-5 で増殖可能なクローン (pBK-NH1-1) が同定された。

pBK-NH1-1 由来 *KpnI-SpeI* 断片 (*nef* 3' end - LTR- *gag* 5' end ) を pLGKSC の *KpnI-SpeI* sites に導入し pLG-NH1-5' を作製した。次いで、pBK-NH1-1 の *SpeI-NarI* 断片 (*gag* 3' end-*pol-vif-vpr-tat-rev-vpu-env-nef*- LTR ) を pLG-NH1-5' の *SpeI-ClaI* sites に導入し、2-LTR linear HIV-1 proviral DNA を含む pLG-NH1 を作製した。さらにプラスミドの大腸菌での増幅効率を改善するために、HIV-1 DNA 全長を含む 10 kb 断片を *BssHII* sites を用いて pLGKSC にクローニングすることにより、p93JP-NH1 を得た。

#### (2) p93JP-NH1 の生物活性の評価

p93JP-NH1 DNA (3 $\mu$ g) を FuGENE 6 を用いて HeLa に導入し、48-72 時間後の培養上清を回収し、milipore filter (pore size 0.45 $\mu$ m) を通して cell-free virus stock (2.8x10<sup>4</sup> [<sup>32</sup>P] cpm RT activity / $\mu$ l) を調製した。ウイルスストックを段階希釈した後、120 $\mu$ l (1.6x10<sup>4</sup>-6x10<sup>6</sup> [<sup>32</sup>P] cpm) を 1) PHA 刺激 PBMC (2x10<sup>5</sup> cells)、2) 10% ヒト血清で分化させたマクロファージ (6x10<sup>5</sup> PBMC 由来)、3) CD4 陽性 T-cell-lines (2x10<sup>4</sup> cells)、4) HOS-R5 と HOS-X4 (5x10<sup>3</sup> cells)、5) NP2-R5 と NP2-X4 (5x10<sup>3</sup> cells)、6) MAGIC-5 (5x10<sup>3</sup> cells) に感染させた。感染後 3 日後から 2 日ごとに培養上清半量 (100 $\mu$ l) を回収し、逆転写酵素活性を測定した。

#### (3) 患者 NH3 の薬剤治療歴

NH3 は、昨年報告した家族内感染例の一員で、タイ起源の subtype E 株に感染したことが既に判明している。NH3 は、AZT/ddI の 2 剤併用治療を 1 年間 (1998 年 1 月 - 同年 12 月)、AZT/3TC とプロテアーゼ阻害剤の 3 剤併用治療を 1 年間 (1998 年 12 月 - 1999 年 1 月) 受けたが、血中 RNA 量の低下は認められず、この間 CD4 cell count も低下した。

#### (4) ウイルス分離

1999 年 12 月に NH3 から末梢血を回収した。血漿濃縮液を MAGIC-5 に感染させ、高濃度ウイルスストック (JP99-NH3-IIvm) を得た。薬剤感受性の比較には、NH3 の治療前ウイルス分離株 (JP93-NH3) を用いた。

#### (5) 薬剤感受性試験

感受性試験は、RT 阻害剤 6 種 (AZT, 3TC, d4T, ddI, ddC, NVP) とプロテアーゼ阻害剤 5 種 (nelfinavir, indinavir, ritonavir, saquinavir, amprenavir) について、蜂谷&岡らの報告した MAGIC-5 系を用いて行った。

#### (6) *pol* 遺伝子配列決定

分離ウイルスより RNA を抽出し、プロテアーゼ全域と逆転写酵素 N 末端半分をコードする領域 (1035bp) を RT-PCR により増幅し、direct sequencing により塩基配列を決定した。

#### (7) 治療前後の血中ウイルス集団の解析

治療前後の末梢血リンパ球プロウイルス

スおよび血漿ウイルスから RT 遺伝子 (543 bp) 領域を PCR で増幅し、pCR-Script Amp SK (+) にクローニングした。プロウイルスおよび血漿ウイルスそれぞれにつき 26-28 個の独立した RT クロームを得た後、塩基配列を決定した。

#### (8) *In vitro* mutagenesis

まず pJP93-NH1 の RT 領域を含むサブクローン pUC-NH1SpBm を作製した。これを用いて PCR を用いた部位特異的変異導入により、NH3 患者に見いだされた点変異および挿入変異を導入し、pJP93-NH1 の RT 変異体 6 種 (ERT-mt1-mt6) を作製した。また、NH3 の血漿ウイルス RNA から RT-PCR により *pol* 領域を増幅し、RT N 末端を含む *BclI*-*Bsu36I* 断片を pJP93-NH1 の相同領域と置換した組み換え体 2 種 (ERT-mt7, mt8) を作製した。

#### (9) RT 変異体の生物活性解析

RT 変異体 DNA を HeLa 細胞に導入後、培養上清より cell-free virions を回収し、RT 活性を測定した。また、段階希釈法により MAGIC-5 で感染価を決定した後、ウイルスの RT 阻害剤 6 種 (AZT, 3TC, d4T, ddI, ddC, NVP) に対する感受性を MAGIC-5 を用いた蜂谷&岡らの方法で測定した。

### C. 研究結果

#### (1) p93JP-NH1 の塩基配列の特徴

1. p93JP-NH1 の HIV-1 subtype E proviral DNA (9721 bp) は subtype B で報告されている全ての遺伝子の ORF を有していた。

2. これまで subtype E LTR 領域に報告されている構造上の特徴を保存していた。
3. 系統樹解析により、タイ流行する subtype E と高い近縁関係にあることが確認された。
4. boot-scanning 解析によりタイ流行する subtype E と同一の recombination break point を有することが確認された。

#### (2) p93JP-NH1 の生物活性

1. p93JP-NH1 DNA は、MAGIC-5 にトランスフェクション後  $\beta$ -gal の発現を誘導した。また、HeLa 細胞にトランスフェクション後、培養上清中に subtype B 分子クローン LAI 株の約 1/2 程度の高い RT 活性が認められた ( $1-3 \times 10^4$  [ $^{32}$ P] cpm RT activity /  $\mu$ l)。
2. p93JP-NH1 由来 cell-free ウイルス感染は、HOS-R5、HOS-X4、NP2-R5、NP2-X4 で効率的に細胞融合を誘導し、subtype B LAI 株と同様のサイズの巨核細胞を形成した。
3. p93JP-NH1 ウイルスは、PHA-PBMC, Macrophage での複製能は微弱もしくは検出限界以下であった。一方、ヒト transformed cell lines (CD4<sup>+</sup> T-cell-lines および CD4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup> or CXCR4<sup>+</sup> adherent cells) では高い複製能を有した (図 2)。

#### (3) 11 アミノ酸挿入変異 RT を有する subtype E 多剤耐性株の分離

1. NH3 患者から治療後に分離され

たウイルス (JP99-NH3-II) は、RT 遺伝子コドン 67 と 68 の間に 33 塩基の挿入変異を有し (図 3A)、耐性試験に用いたヌクレオシド類似体全てに高度耐性となっていた (図 3B)。

2. 系統樹解析により、JP99-NH3-II は、NH3 の薬剤感受性株より進化したことが示唆された
3. 治療前後での患者血液中 (末梢血リンパ球と血漿) のウイルスポピュレーションの変動を調べたところ、  
(i) 治療前の挿入変異をもたない集団が、治療後には、挿入変異株集団に置き換わっていたこと、(ii) 挿入変異株集団では、挿入変異の他に 3-4 箇所の AZT 変異、および insertion 下流の点変異が生じていることが明らかになった。

#### (4) RT 挿入変異と点変異のウイルス形質に与える影響

1. RT 挿入変異体の RT 活性は、p93JP-NH1 と比べ 1/2~1/10 に低下した (図 4B)。
2. RT 挿入変異体は、MAGIC-5 において p93JP-NH1 と同等の感染価を有していた (図 4B)。
3. 薬剤感受性試験により、i) 挿入変異単独では多剤耐性を発現しないこと、(ii) 挿入変異に palm subdomain の AZT 耐性変異 (210W, 215Y) が加わると多剤耐性が発現すること、(iii) insertion 下流の点変異は、耐性度を増強する働きを持つこと、が明らかとなった (図 5)。

#### D. 考察

##### p93JP-NH1 の樹立

p93JP-NH1 ウイルスは、Tat 依存性プロモータからの遺伝子発現を誘導できる (結果 2-1) ことから Tat 機能を保持していると考えられる。また、CD4 と CXCR4 あるいは CCR5 を使用して細胞侵入あるいは細胞融合を誘導できる (結果 2-2) ことから *rev*, *env* 機能を保持していると考えられる。さらに、感染後培養上清に逆転写酵素活性が検出されることから、*pol* 遺伝子産物の機能、および粒子形成能を保持していると考えられる (結果 2-3)。また、ゲノム配列の解析からは、遺伝情報の明確な欠損は確認できなかった (結果 1)。

しかしながら、p93JP-NH1 の培養細胞系における増殖は、transform した細胞に限定されていた (結果 2-3)。クローニングの出発材料である NH1 株は PHA-PBMC とマクロファージで増殖可能であった。従って、p93JP-NH1 は original virus stock 中のマイナーなクローンかもしれない。ただし、ストック中のメジャーなウイルスを代表している可能性も否定できない。例えば、ストック中のウイルスは大多数が p93JP-NH1 同様単独での増殖能は低い、重感染を通じて欠損機能の complementation が起きて効率的な増幅が可能になっているのかもしれない。

また、今回の結果から、PHA-PBMC やマクロファージには、transformed cell に存在する p93JP-NH1 の増殖促進因子が欠損しているか、または増殖阻害因子が

存在していると考えられる。

### p93JP-NH1 の応用

今回得られた分子クローンは、subtype E の耐性変異候補の役割を subtype E の遺伝背景で確認するのに有用であると考えられる。第一に、p93JP-NH1 ゲノムは、全長に渡りタイで流行する subtype E と高い近縁性を示すことから、subtype E genotype を代表するクローンと考えてよい。第二に、効率良く増殖する培養細胞系も複数得られていることから、変異がウイルスの fitness に与える影響を調べることが可能である。

患者材料から得られたウイルス遺伝子および形質情報に、p93JP-NH1 を用いた変異解析の結果を併せた結果、subtype E RT の構造と機能について以下のことが明確になった。まず第一に、subtype E RT の  $\beta 3$ - $\beta 4$  ループは、最近 subtype B で指摘された性質、すなわちアミノ酸挿入変異を許容する可塑性を有していることを明確にした。さらに注目すべき点として、この可塑性は非常に高く *in vivo* 進化過程で 1 アミノ酸残基ものペプチド配列挿入を許容しうることを初めて示した。第二に、この挿入変異は、*in vivo* では、特定の点変異と連関して存在することを示し、これらの変異の耐性獲得における synergistic な効果が示唆された。実際、この点は p93JP-NH1 を用いた変異解析により確認された。すなわち、挿入変異は単独で耐性を付与する能力は無いこと、AZT 耐性変異を含む特定の点変異と協調して初めて高度の多剤耐性を発現する能力を持つこと、を明らかにした。

### 挿入変異の進化における役割

HIV 遺伝子の挿入変異は、点変異に比べ進化上の役割が注目されることが少なかった。一方、HIV RT は逆転写反応中にしばしば template-primer misalignment や template switch をおこすこと、感染者体内では 1 日に  $10^{10}$  前後の多量の子孫ウイルスが産生されていること、などを考慮すると *in vivo* では比較的高頻度に挿入変異体が作られている可能性がある。今回の結果は、挿入変異がウイルスに高度の選択優位性を付与していることを示している。すなわち、挿入変異は、HIV が強い選択圧にさらされた際、適応変化するのに重要な役割を果たしうると考えられる。このような、比較的高いペプチドの挿入変異による適応変化は、インフルエンザやポリオウイルスなど他の RNA ウイルスでは数例報告があるが HIV では初めてである。

### E. 結論

Transform した細胞で効率よく増殖する HIV-1 subtype E X4/R5 株分子クローン p93JP-NH1 を樹立した。患者材料の解析と分子クローンの変異解析により、新たな薬剤耐性変異を同定した。これにより、p93JP-NH1 は、subtype E の薬剤耐性変異の決定に有用であることを示した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Shino T, Kato K, Kodaka N, Miyakuni T, Takebe Y, **Sato H**: A

- group of V3 sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtype E nonsyncytium-inducing, CCR5-using variants are resistant to positive selection pressure. *J. Virol.* 74: 1069-1078, 2000.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
2. 学会発表
- 1) Sato H., Tomita Y., Shibamura K., Shiino, T., Tatsumi M., Gushi K., and Takebe, Y. Convergent evolution of RT gene between HIV-1 subtypes E and B following RT inhibitor therapy. XIII International AIDS Conference, Durban, South Africa. 9-14 July, 2000.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得 なし
  2. 実用新案登録 なし
  3. その他 なし



厚生科学研究補助金 (エイズ対策事業)

分担研究報告書

HIV-1 E 型 oligomeric envelope protein gp120-gp41 の高次構造と抗原性の解析。

分担研究者 杉浦互 国立感染症研究所 エイズ研究センター

研究要旨

サブタイプ E HIV-1 のエンヴェロープ gp120 の抗原性を解析するためにモノクローナル抗体を作成した。合計 9 個のモノクローナル抗体を作成しその抗原特異性の解析を行った。その結果\*がサブタイプ E を特異的に認識することが明らかになった。OKT4 エピトープ欠損 CD4 分子について遺伝子解析と各種 HIV-1 に対する感受性の評価を行った。遺伝子解析の結果 250 の変異であることが明らかになった。感染性の解析ではの可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々は昨年までに HIV-1 subtype E に属する CM235 株の envelope を基にした oligomeric gp140 (CM235-gp140) を作製し、その抗原性が優れたものであることを明らかにしてきた。さらに CM235-gp140 を特異的に認識するマウス単クローン抗体の作製を行い、9 個の単クローン抗体の作成に成功した (C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9, C10, C11)。本年度は作成した抗体の特異性について解析を行った。加えて、本年度からは日本人のに見られるとされている OKT4 エピトープ欠損 CD4 分子について (1) HIV-1 に対する感受性と (2) と細胞膜上における co-receptor すなわち CXCR4 あるいは CCR5 分子との相互作用の解析を行った。

B. 研究方法

1) CM235-gp140 特異的単クローン抗体の作製

精製 CM235-gp140 と CM235-gp120 を各々 2 匹の BALB/c マウスに感作した。感作は各抗原 20 µg を LiBi アジュバンドとともに約 3 週間の間隔で 3 回行い、最終感作 4 日後に抗体価を確認した。抗体価の上がっていたものをさらに再感作し、その 4 日後に屠殺、脾臓よりリンパ球を取りだし P3X63Ag8 ハイブリドーマ細胞と融合させた。

2) CM235-gp140 特異的単クローン抗体の解析

Protein G-Sepharose beads を各抗体 20ug と 2-3 時間混合した後、<sup>35</sup>S Methionine 標識した CM235-gp140, IIIB-gp140, あるいは 89.6-gp140 を加え 4°C で 16 時間混合反応させる。反応後 beads を洗浄し、その後結合している標識タンパクを抽出し、SDS-PAGE を行い、オートラジオグラフィーにて各抗体とタンパクの結合の評価を試みた。CM235-gp140 については Western blotting も行い、抗体の認識するエピトープが連続した配列を認識している (linear) か高次構造に依存している (conformational) かの判定を行った。さらに、CM235 V3 ペプチドを合成し、96 穴プレートに固着化し、ELISA を行い各抗体が V3 を認識するか判定した。

3) OKT4 エピトープ欠損 CD4 遺伝子のクロー

ニングと遺伝子配列解析

CD3 陽性、OKT4 陰性かつ OKT4a 陽性を呈する患者のリンパ球より mRNA を採取し RT-PCR を用いて CD4 遺伝子を増幅し、pT7 クローニングベクターを用いてクローニングを行った。尚、血液採取に当たっては患者に研究目的を説明をし同意をとっている。クローニングの後遺伝子配列の解析を行った。

4) HIV-1 に対する感受性の解析

CD3 陽性、OKT4 陰性かつ OKT4a 陽性を呈する患者のリンパ球を PHA で刺激して芽球化させた後に in vitro における HIV-1 の宿主細胞として用いた。

5X10<sup>5</sup> 細胞に対して 100TCID<sub>50</sub> の NL4-3 あるいは CM235 ウイルスを感染させた。感染後は 2-3 日毎に 100ul の上清を回収し新たな培養液を 100ul 加え、2 週間培養を維持した。回収した上清の p24 産生量を測定しウイルスの増殖を解析した。

C. 結果

1. CM235-gp140 特異的単クローン抗体の解析  
結果を表 1 にまとめた。CM235, IIIB, 89.6 各 gp120 に対する反応を免疫沈降で確認し、その結果 9 個の抗体 (C2, C3, C4, C6, C7, C8, C9, C10, C11) のうち、C4, C6, C7, C9 の 4 クローンが clade E を特異的に認識することが明らかになった。C3 と C10 は CM235, IIIB, 89.6 全てを認識し、C11 は CM235 と IIIB を、C2 と C7 と C8 は CM235 と 89.6 を認識した。また C4, C7, C9, C11 の 4 クローンが高次構造を認識する抗体であることが明らかになった。また CM235V3 peptide に対する反応を ELISA で測定したところ、V3 領域を認識するものは一つも無かった。各抗体のより詳細な抗原認識領域とウイルス中和活性に関しては現在解析を行っている。

2. OKT4 エピトープ欠損 CD4 分子の遺伝子解析とクローニング。

配列結果を図 2 に示す。その結果 Codon 240 の arginine が tryptophan に置換されていることが明らかになった。この変異はすでに Hodge TW 等により報告されている変異であ

り、日本人と一部の黒人に見出されることが知られている。(Human Immunology 30, 99-104, 1991)

3. OKT4 エピトープ欠損 CD4 分子発現細胞の各種ウイルスに対する感受性の解析。  
NL4-3 (T-tropic), B301657, CM235, CM241(この3株は M-tropic) 各ウイルスを正常 CD4 発現細胞と、OKT4 エピトープ欠損 CD4 分子発現細胞各々に感染させ、増殖動態の比較を試みた。図2に見るように、mutant CD4 発現細胞では NL4-3、すなわち T-tropic HIV-1 の増殖が健常人の細胞と比して遅れる結果を示していた。

#### D. 考察と結論

##### 1. 抗 CM235 抗体の解析

今回の解析では V3 領域を認識する抗体は9個の抗体中一つも無かった。我々が過去に行った抗サブタイプ Bgp140 抗体を作成したときにも今回同様に V3 領域を認識する抗体の頻度はきわめて低かった。これら2つの結果は正常に folding されている状態では V3 領域が Immunodominant ではない可能性を示唆している。また興味深いことに CM235 特異的抗体4クローン (C4,C7,C9,C11) のうち3クローン (C4,C7,C9) が conformation dependent epitope を認識する抗体であった。

##### 2. OKT4 エピトープ欠損 CD4 分子発現細胞の解析

この変異による免疫機能の異常は報告されていない。また HIV-1 の感染性についても gp120 との結合部と離れており影響はないとされている。しかしながら細胞膜上のほかの分子、CXCR4 あるいは CCR5 等の co-receptor、との相互作用については解析されていない。立体構造上の変異は (図3) 細胞膜に近い2番目の domain 最外側に位置していることがわかる。変異 CD4 と co-receptor の関係を探るために、M-tropic と T-tropic ウイルスの増殖動態の比較を試みた。その結果 T-tropic の一つである NL4-3 が変異 CD4 発現細胞で増殖がやや遅れていることが明らかになった。しかしながらヒト PBMC を用いた実験では他の因子の影響が考えられ、認められた違いが変異 CD4 に帰因するのか判定が困難である。そこで我々は正常 CD4、変異 CD4 を発現するベクターを作成し、Hos 細胞に導入し細胞株を樹立することを試みている。樹立した時点で改めてウイルスの増殖動態の解析を行う予定である。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp140.

Earl PL, Sugiura W, Montefiori DC, Broder CC, Lee SA, Wild C, Lifson J, Moss B  
J Virol, 2001, Vol 75, p645-653

##### 2. 学会発表

該当なし

厚生労働省科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)

分担 研究報告書

ゲノム RNA の複製に関わる宿主因子の解析

主任研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 ゲノム RNA の逆転写に関与する宿主 topoisomerase I と細胞内での局在を同じく核小体とする宿主 C23 はゲノム RNA の安定性を上昇させることにより、HIV-1 複製の効率化を担っていることが判明した。この時、topoisomerase I との相互作用が必要であるか、ウイルス発芽に影響を及ぼしているか、ウイルスに取り込まれる等に関してさらに解析が必要である。

#### A. 研究目的

HIV-1 RNA ゲノムが感染細胞において逆転写されるところに複製の律速段階があり、宿主因子が関与する機構を解析することにより、抗ウイルス剤開発の基礎とすることを目的とした。本研究では特にウイルス産生細胞でゲノム RNA に直接関与する機構を調べた。この機構はウイルス粒子を経て感染細胞での逆転写に関わることが予想される。

3. 1 において転写されるゲノム RNA を比較した。
4. 1 の細胞へアクチノマイシン D を加え、転写を阻害してから、RT-PCR により RNA の安定性を比較した。
5. 1. の細胞由来のウイルスを HIV-1 感染の可能な細胞により、複製を比較した。

#### B. 研究方法

宿主 topoisomerase I は逆転写効率を *in vitro* または溶解したウイルスを源として上昇させるが、さらに本酵素に N 末端で結合する因子のうち C23 及び PSF の作用を、ウイルス産生細胞において調べた。

1. COS 1 細胞に infectious clone DNA とそれぞれの発現ベクターをコトランスフェクションした。
2. 上清および、細胞中のウイルス抗原量を比較した。

#### C. 研究成果

1. COS 1 細胞に infectious clone DNA とそれぞれの発現ベクターをコトランスフェクションしたところ、C23 を発現させたときのみ、上清中のウイルス粒子が 4 倍程度上昇し、細胞中のウイルス蛋白も発現が上昇した (Fig.1)。
2. RNA の転写自体は C23 の発現に関わらず不変であった。
3. RNA の転写をアクチノマイシン D によって阻害し RT-PCR によ

て RNA の安定性を調べたところ、C23 の発現によりゲノム RNA の安定性が増すことが判明した (Fig.2)。

4. C23 の発現によってウイルスの感染効率が上昇しなかった。

#### D. 考察

C23 は何らかの機構によりゲノム RNA の安定性を増していると考えられた。またゲノム RNA へ影響を及ぼしていることから、ウイルス粒子を経て感染細胞での逆転写に影響を及ぼしていることも予測される。C23 はマウスレトロウイルスではウイルスの発芽に影響を及ぼしていることから、HIV-1 においても発芽へ影響を及ぼしている可能性が考えられる。一方、粒子に取り込まれる宿主因子 topoisomerase I とは N 末端で結合していることから、共同して RNA に働きかけている可能性もあると考えられた。

#### E. 結論

宿主 C23 は HIV-1 ゲノム RNA の安定性を上昇させることにより、ウイルスの賛成効率、感染後の逆転写に影響を及ぼしていることが判明した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kenny K, Brechtel C, Takahashi H, Kurohara K, Anderson P, Gibbs CJ Jr. An enzyme-linked immunosorbent assay to quantify 14-3-3 proteins in the cerebrospinal fluid of suspected Creutzfeldt-Jakob disease patients. *Ann Neurol.* 48(3):395-398. 2000

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

Hasegawa, H., Kadowaki, S., Takahashi, H., Iwasaki, T., Tamura, S., Kurata, T. Protection against influenza virus infection by nasal vaccination in advance of sublethal irradiation. *Vaccine* 18:2560-2565, 2000

##### 2. 学会発表

庄谷裕子、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 複製制御機構に関する研究第 48 回日本ウイルス学会総会 2000

上野智規、庄谷裕子、千葉 丈、倉田 毅、高橋秀宗宿主 topoisomerase I の HIV-1 粒子へのパッケージ機構に関する研究第 48 回日本ウイルス学会総会 2000

#### G. 知的所有権の取得状況 なし