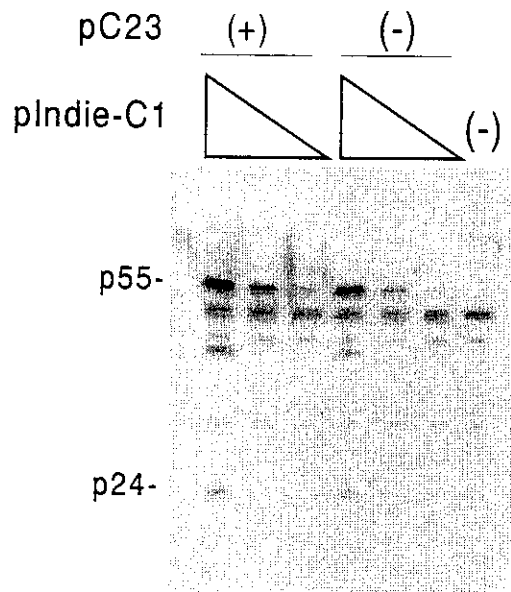
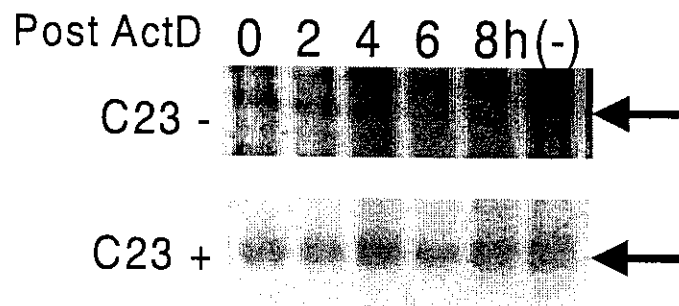


Fig.1 ウェスタンブロットによるgag蛋白発現量の解析



C23をCOS細胞で発現することにより、同時にトランスフェクションしたHIV-1gag蛋白の増加させることができた。

Fig.2 RT-PCRによるゲノムRNAの安定性解析



アクチノマイシンD (ActD)により転写を抑制し、HIV-1 gagRNAの安定性を見たところ、C23の発現によりHIV-1 RNAの安定性が増加していたことが判明した。

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

分担研究者：巽 正志 (国立感染症研究所獣医科学部)

共同研究者：草川 茂, 武部 豊 (国立感染症研究所エイズ研究センター)

研究要旨：先に報告した HIV Trapping System を用いた感染性クローン構築系を用いて現在中央および西アフリカで感染者が激増している CRF02_AG 組換体の感染性クローンを分離し、その遺伝子構造とウイルス学的性質を解析したところ、IbNG に遺伝子構造が酷似し、その感染性は PBMC では示されず形質転換細胞群に限局していた。

1. 目的

現在までの HIV 研究は主に欧米に流行している subtype B の Molecular clones を用いてその病原性を担う遺伝子領域が検索されてきた。しかしながら最近の HIV-1 の感染中心は欧米からアフリカ、東南および南アジア地域に移行しており、そこで主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype C, subtype A および subtype E が多くを占めている。HIV-1 subtype B は異性間の感染も認められるが主に homosexual および麻薬静注者などの risk group に侵淫していることが知られている。一方、Subtype 間における感染経路による感染効率の違いが指摘されているにもかかわらず、subtype B 以外の感染性クローンが得られていないため、その違いに由来する HIV-1 subtype 間の遺伝子構成の相違に基づく病原性解析の進展における隘路になっている。本研究は subtype B 以外の発展途上国で流行している subtype の感染性クローンの樹立を試み、将来のワクチン開発および subtype によるウイルスの病原性解析の分子基盤を整備することを目的とする。

本年度は、西・中央アフリカにおける流行に大きな寄与を果たしている circulating recombinant form (CRF02_AG) の

感染性分子クローンの分離に成功したので、その構造的特徴とウイルス学的性質について解析を進めた。

2. 方法

HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告した HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系 (HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系) により行った。対象としたウイルスは HIV-1 subtype A の流行地域である中央アフリカ象牙海岸に位置するガーナ国で、日本国の JICA 支援により現地の野口英世記念医学研究所で採取された検体である。1997 年に、ガーナ人女性から分離された NJ97-42 株を MAGIC5A 細胞でプラーク純化した。得られたウイルスを感染させた HeLa4.5 細胞 (CD4 および CCR5 発現 HeLa 細胞株) からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として、Long PCR を行い 5'-および 3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長の DNA クローンを得た。10 個のクローンのうち、1 個 (p97GH-AG1) が MAGIC5A で感染性を示した。p97GH-AG1 の全塩基配列を決定

し、近隣結合法によって系統樹を作成しその帰属を決定した。コレセプター使用域を HOS および NP2 細胞（群馬大星野教授より供与）に CD4 および Coreceptor CXCR4 あるいは CCR5 を発現した細胞株によるアッセイ系を用い決定した。さらに、PBMC での感染性を検討した。

3. 結果

プラーク純化した HIV-1 NJ-42 株を感染させた HeLa4.5 細胞ゲノムを鋳型に図 1 のように 5'LTR から PBS までの Short Genome を pBR322 由来 Vector pBRSK9 に組み込み、PBS

領域近傍の多くの HIV-1 で保存されて、なおかつ Unique Site ある Kas I/Nar I と Rare Cutter Not I を利用して 9.0 Kbp に及ぶ Near-Full Length genome を Long PCR で増幅し、両制限酵素で処理した後組込んだ。組み込まれた Plasmid を、Tat 蛋白発現により核移行シグナルを付加した EGFP を HIV-LTR 下流に組み込んだ発現ユニットを有する細胞株 HeLa 4.5/nEGFP に Transfection 2 日後核仁に EGFP 発現陽性で Syncytium 形成が陽性にできるクローンを選択した。しかしながらその培養上澄には、次の MAGIC-5A 細胞への感染性をもつウイルス粒子は p24 抗原が陽性であるのにも拘わらず得られなかった。Monitor 細胞株 HeLa 4.5/nEGFP で EGFP 陽性で、Syncytium 陽性なことから Tat, Rev および Env 蛋白は有効に機能していることが推察されることから、構築した全長ゲノム Plasmid の右半分はその Functionality が保存されていると考えた。そこで左半分の

ゲノムの入換え戦略をとった。即ち Vpr 領域にある Unique Site Nco I site を含む Reverse Primer を作製し、3'LTR の塩基配列から 5'LTR Start からの Forward Primer の組み合わせで 5'LTR から Vpr まで増幅し、両酵素処理後、先の全長 Plasmid と組換えた。Transfection 後の培養上澄を MAGIC-5A に感染させ感染陽性であるクローン p97GH-AG1 を選別した。

この感染性クローン p97GH-AG1 の全塩基配列を決定し遺伝子構造を解析したところ以下の事項が判明した。

全長の系統樹

97GH-AG1 の全塩基配列を決定し、9 つのウイルス蛋白をコードするオープンリーディングフレームが存在することを確認した。

他の Subtype の reference sequence との Alignment をもとに Kimura-2-parameter 法により genetic distance matrix をつくり、近隣結合法にて系統樹を作成したところ、97GH-AG は IbNG に代表される CRF02_AG とクラスターを形成し、そのクラスターのブーツストラップ値は 100 であったので、97GH-AG1 は CRF02_AG に属することが判明した（図 2）。

Similarity Plot

Reference としては、各 Subtype の代表的な株のコンセンサスシーケンスを用いて、97GH-AG1 と CRF02_AG の代表株である IbNG の全塩基配列を 5' 側から 500bp ごとの相同性を 10bp 毎ずらして計算し、グラフ上にプロットしたところ

全長に亘り高い相同性を示していた。

97GH-AG1 は IbNG と同様に全域において CRF02_AG と相同性が最も高かった。

また Subtype A および G に対する相同性のパターンも 97GH-AG1 と IbNG との間で酷似していた。

Bootscanning Analysis

97GH-AG1 と IbNG の Break Point の位置を比較するために Bootsanning 解析を行った。500bp ごとのブーツトラップ系統樹から得られたブーツトラップ値を 100bp 毎ずらして計算していきグラフにプロットした。グラフが上の方にあるほど、そのサブタイプとの間で形成されるクラスターの信頼性が高いことを示している。この解析により 97GH-AG1 と IbNG が、同じ組み換えのパターンを持つことが判明した(図3)。この結果各 Break Point で分割した Alignment をもとに近隣結合法によって系統樹を作成し、Similarity plot および Bootsanning によって得られた結果が正しいことが確認された。

サブタイプ帰属不明領域および 97GH-AG1 と IBNG の間で帰属するサブタイプの結果が異なっていた領域の系統樹解析

上記の遺伝子解析の結果、97GH-AG1 と IBNG で帰属不明領域等を系統解析した結果、97GH-AG1 pol 5' 側は、CRF02_AG が独立したクラスターを形成し、97GH-AG1 vif 5' および 3' 側は A、G、CRF02_AG が混在し、サブタイプ分類が困難であった。また env 3'~nef 5' 側領域は 97GH-AG1、

IbNG 共にサブタイプ A に帰属することが判明した。

感染実験

p97GH-AG1 を HeLa 細胞に FuGene 6 を用いて transfect 2 日後の培養上澄には、感染性クローン pLAI, pAD8 および pIndie-C1 と同等な RT 活性を検出した。この培養上澄をウイルスストックして感染実験に用いたところ、PBMC 培養では検出される増殖を認めなかった。一方、p97GH-AG1 は構築途上での Coreceptor Usage は CD4/CXCR4 のみを発現する MAGI 細胞では増殖せず、さらに CCR5 を発現する MAGIC-5A では増殖することから R5 HIV-1 であることが推察されていた。Coreceptor Usage をさらに確かめるため、他の Cell line を用いて検討した。その結果、97GH-AG1 は CCR5 発現 NP2/CD4/CCR5 および HOS/CD4/CCR5 で増殖したことから R5 HIV-1 クローンであることが確認された(図4b)。97GH-AG1 は NP2/CD4/CCR5 細胞株でのみ Syncytium を形成し、NP2/CD4/CXCR4 では形成しなかったことからウイルス増殖結果を確認した(図4a)。

4. 考察

本年度は、西・中央アフリカにおける流行拡大の主要な原因ウイルスとして浸淫している circulating recombinant form (CRF02_AG) の感染性分子クローン p97GH-AG1 の分離に成功し、その分子遺伝子構造的特徴とウイルス学的性質について解析を進めた。

分子遺伝子学的解析の結果、p97GH-AG1

は、ナイジェリア由来の IbNG 株に代表される CRF02_AG と同一のサブタイプ A/G 間の組換え構造をもつことが明らかになった。

HOS および NP2 細胞を用いた infectivity assay によって R5 型ウイルスであることが明らかになった。97GH-AG1 ウイルスは、MAGIC5A や HOS, NP2 細胞など不死化細胞では、複製可能であるが、PBMC での progeny 産生は検出限界以下であった。この PBMC での明らかな Progeny Virus 産生を認めなかった原因についてはいくつかの要因が考えられる。この感染性クローン p97GH-AG1 構築の出発材料となった種ウイルスは、PBMC の Coculture で分離されたものであるが、ウイルスクローニング段階で MAGIC-5A で増幅培養をしている。MAGIC-5A は Phytoomitogen 刺激 PBMC よりも格段の CD4/CCR5 発現を増強されていることから、混在する PBMC 培養分離ウイルス群からより CD4/CCR5 依存性の高いウイルス株を選択してきた可能性が指摘される。このことは現在まで、この同じ親株ウイルスからいくつかのクローンを分離しているので確認しえる。次に一番蓋然性が高い可能性として、やはり Long PCR 法そのもの、即ち PCR DNA Polymerase の Fidelity に由来する、いまだ同定出来ないウイルスの機能的な欠損である。この点に関しては、既にこの感染性クローン構築法により PBMC で複製可能な 世界で最初の Subtype C 感染性クローン pIndie-C1 の構築過程でも経験したことから、今後さらに PBMC でも複製可能なクローンを構築することにより、

PBMC で Full-Potential に複製するにはどのウイルスゲノム領域が重要であるか貴重な知見が得られる可能性があると考ええる。また DNA Polymerase の Fidelity の向上は今後十分に期待されることから、今後ともこの感染性クローン構築系の戦略を改良しながら続ける価値はあるものと思われる。次に、その可能性は低い、MAGIC-5A により増殖できる HIV-1 の Spectrum は PBMC よりも広い可能性があることを指摘しておきたい。即ち現在まで、PBMC で分離した HIV-1 は全て MAGIC-5A で増殖を確認している。また PBMC で 4 週間に亘って培養を続行しても分離できなかった患者血漿 (HIV-RNA copies $10^5/ml$) から 2 日間で分離でき、その薬剤耐性試験に基づき薬剤を変更したところ検出限界以下にウイルス量が激減した経験がある (佐藤、蜂谷、岡、巽、未発表データ)。また現在の抗 HIV 療法の主流となりつつある HAART 療法の停止により Rebound して増殖するウイルスは、今まで考えられていた Memory T Cell に潜伏している HIV-1 Provirus のみではなく、PBMC 以外の、いまだ同定できない細胞群で継続的なウイルス産生がある可能性が指摘されている。このような観点からも、今後分離ウイルスの様々な細胞群での増殖能を、その遺伝子構造と関連づけて解析する必要があるものと考えられた。

5. まとめ

タイを中心とする東南アジア地域の流行の原因となっているサブタイプ E (CRF01_AE)とならび世界流行の形成に関

与している代表的な CRF の一つである CRF02_AG の感染性分子クローンの分離に成功した。このクローンを出発材料としてクレイド/CRF 特異的研究試薬の開発が期待される。またこのクローンは不死化細胞においては増殖できるが、PBMC 中では増殖能を欠くことから、両細胞種における増殖能の差異を規定する未知の determinant(s)が存在することが示唆される。

6. 参考文献

Howard, T.M and Rasheed, S: Genomic structure and nucleotide sequence analysis of a new HIV type 1 subtype A strain from Nigeria. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12: 1413-1425.

Mochizuki,N., Otsuka, N., Matsuo, K., Shiino,T., Kojima, A., Kurata, T., Sakai, K., Yamamoto,N., Isomura,S., Dhole,T.N., Takebe,Y., Matsuda,M. and Tatsumi, M.: An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15:1321 – 1324, 1999.

論文発表

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., Tnaka, 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.

学会発表

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 のアクセサリー蛋白 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。

7. 図説明

図 1 : CRF02_AG 感染性クローン p97GH-AG1 の構造と構築過程。PCR 増幅に用いた Primer の位置と、再構築過程を示す。詳細は本文参照。

図 2 : 全塩基配列に基づく p97GH-AG1 の系統樹。P97GH-AG1 の全塩基配列を HIV-

1 group M の各 Subtype と alignment し NJ 法にて系統樹を作成した。97GH-AG1 は IbNG を含む CRF02_AG Recombinant 群と Cluster を形成する。

図 3 : (B) 各種 Subtype 参照株との相互関係を示す Bootstrap plot. Subtype B, D, E および G 株に対する Bootstrap 値は無視しえるほど低かったので Subtype A, C, G, H および J 株にたいする値のみ Plot した。Subtype A と G に対応する領域は >90% の高い Bootstrap 値を示した。Subtype A と G で交差する点は Recombination Breakpoint を示している。

(C) 97GH-AG1 と CRF02_AG Recombinant の Prototype である IbNG との Bootscan Plot. 比較のため Subtype B と C の参照株も含めた。

(D) 上記の解析結果から推測される 97GH-AG1 株の組換え遺伝子構造。白抜きの領域は未同定領域を示す。

図 4 : (A) 各種感染性クローンを Transfect した培養上澄中の逆転写酵素活性。

(B) 97GH-AG1 の NP2-CD4 由来細胞株での増殖と Coreceptor Usage. (A) で得られたウイルスを NP2-CD4-CXCR4 および NP2-CD4-CCR5 に感染させウイルス増殖を RT 活性で測定した。97GH-AG1 は親ウイルスと同様 CCR5 Usage であった。

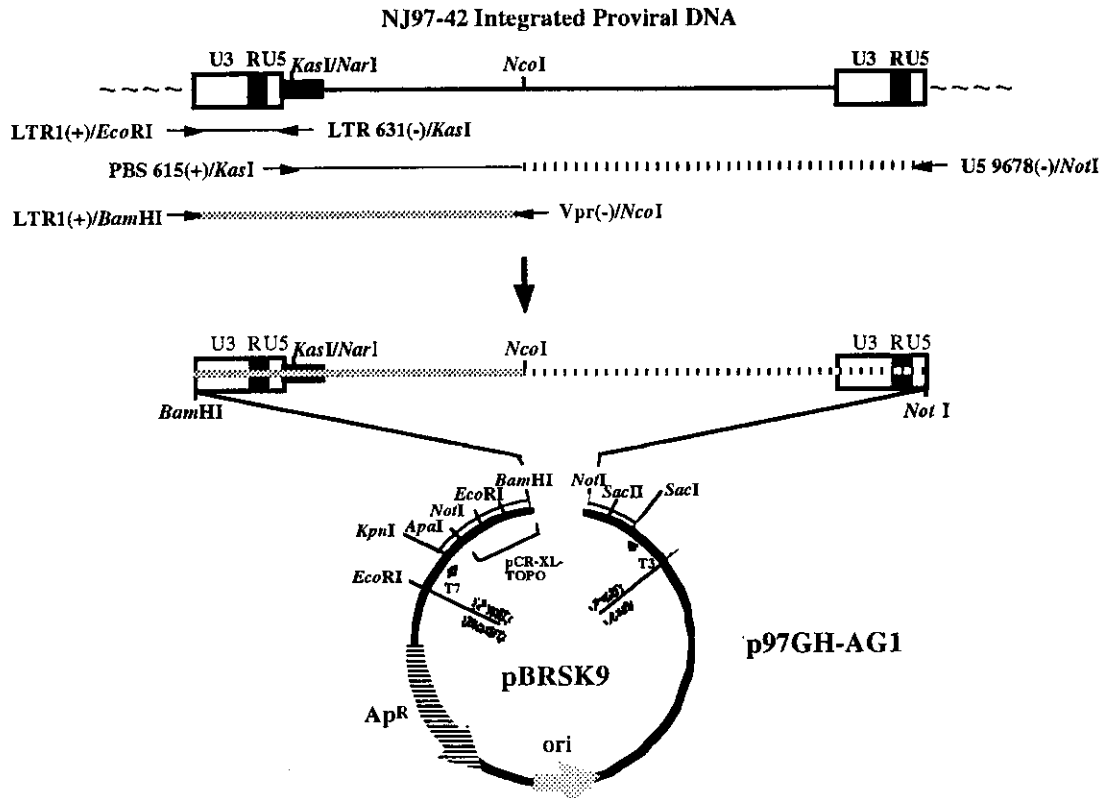


图 1 : The scheme of construction and structure of full-length HIV-1 CRF02_AG molecular clone p97GH-AG1

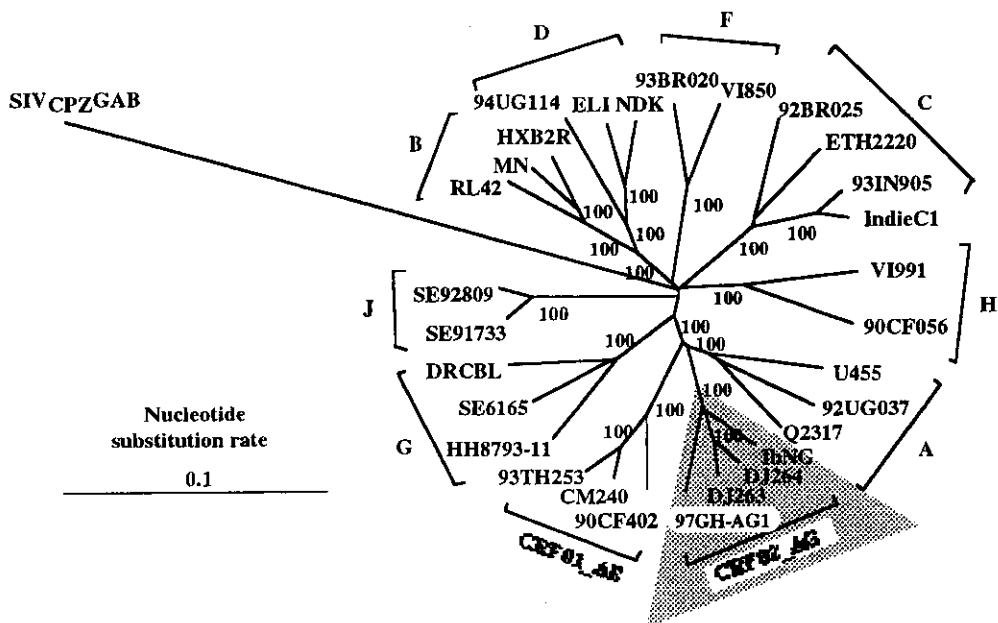


图 2 : Phylogenetic tree based on full-length nucleotide sequence

(A) **Transfection of p97GH-AG1**

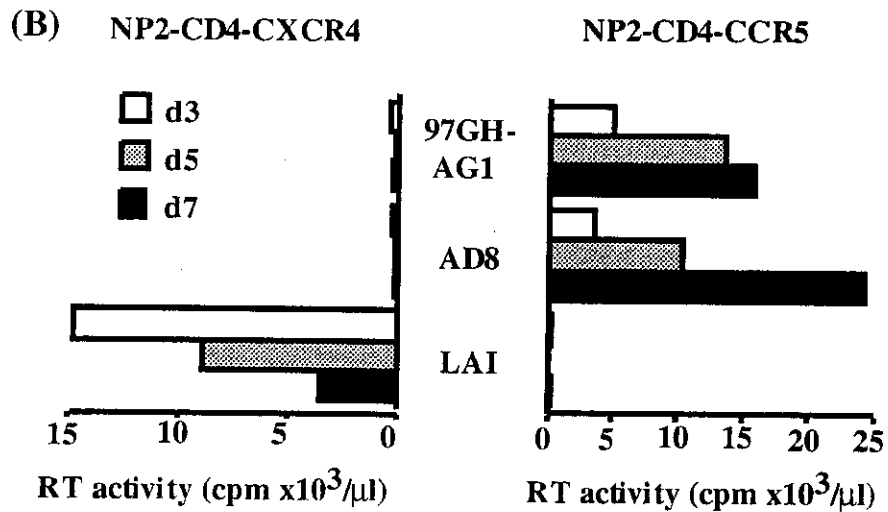
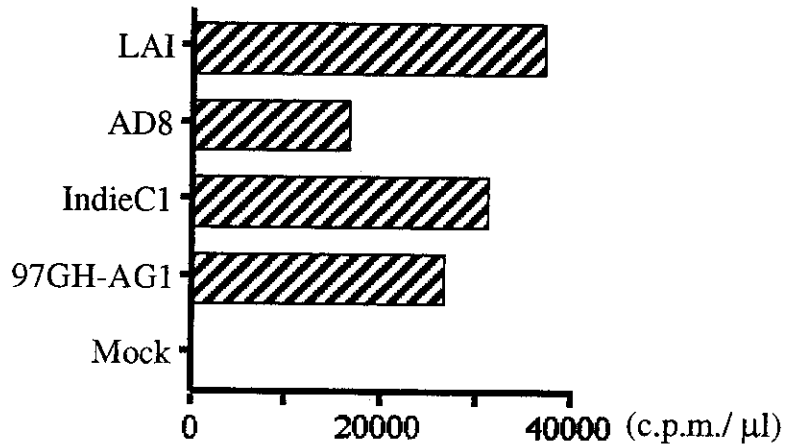


Fig.4 : (A) Reverse transcriptase activity of supernatants derived from 203T cells transfected with several infectious clones. (B) Replication kinetics and coreceptor usage of 97GH-AG1 in NP2-CD4 cell infectivity assay.

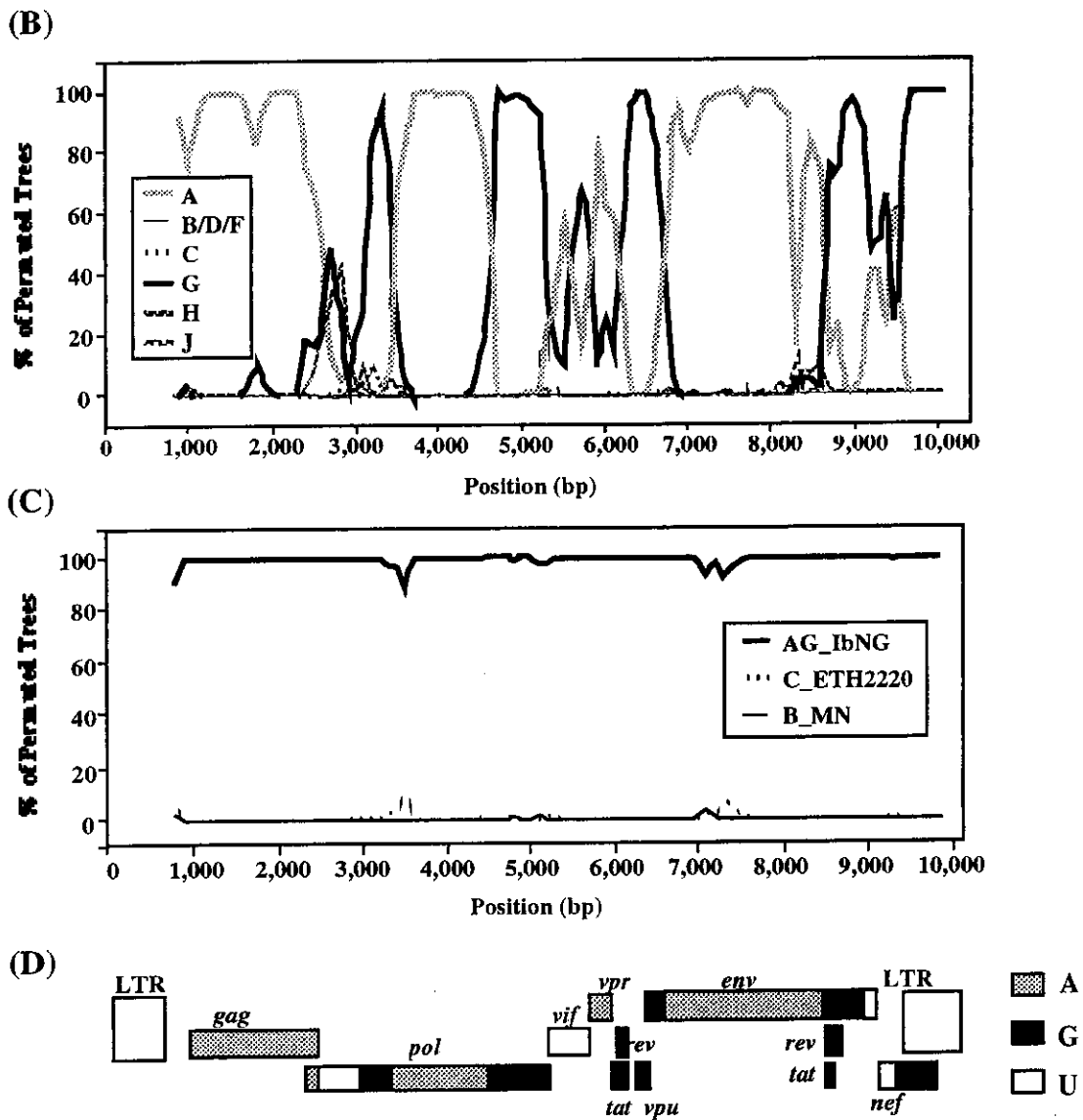


Fig.3 : (B) Bootstrap Plots depicting the relationship to the indicated reference strain of respective subtypes. (C) Boots can plot of 97GH-AG1 with the prototype CRF02_AG strain, IbNG, in comparison with those with the subtype C and B reference strains. (D) The deduced recombinant structure of p97GH-AG1.

日本のHIV-1の遺伝子・分子生物学的解析（集団的解析）

分担研究者 仲宗根正 国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究要旨：日本に蔓延しているHIV-1に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本のHIV-1について遺伝子学的・分子生物学的特徴を経年的に明らかにすることを目的とし、今年度は以下の研究成果を得た。

① 1996年以来持続しているウイルス分離率の低下傾向は2000年も継続しており、いまだ底値に達していない。

② 超高感度RT活性測定法を開発した。これによるとウイルス0.8copy相当量のRT活性を検出できる。

③ 日本のHIV-1集団のうち垂直感染集団について、昨年度までに得られた結果に加えて、比較対象としてタイ国の垂直感染集団を解析した。その結果、

a) 集団でみた場合、日本の母親由来HIV-1集団は、様々なサブタイプ(A,B,D,E,G)が混在する雑多な集団であり、一方、児由来HIV-1も今のところ4つのサブタイプ(B,D,E,G)が確認され、やはり雑多な集団である。一方、タイ国では母親・児由来HIV-1集団ともに、単一サブタイプEのみの均一集団である。

b) 多クローン解析により個々でみた場合、両国共に母親個体内のHIV-1はquasispeciesが強いのに対して、児体内HIV-1は、単一クローン傾向にある。

c) 両国共に、殆どの垂直感染ウイルスはCCR5指向ウイルスと推測された。

協力研究者

原敬志 国立感染症研究所・エイズ研究センター
本多三男 同

浜野隆一 タイ国立健康研究所

Paijit Warachit 同上

Tawee Chotpitayasunondh タイ国立Sirikit
女王子供病院

ス反応を行い、自動シーケンサーにより塩基配列を決定する。1999年と2000年のサンプルから200個のDNAを抽出済みで、2001年のサンプルと合わせてシーケンスを決定し、ここ3年間のJCSを決定し、1988-1993年と1996-1998年のJCSと比較予定である。

(2) V3領域における日本伝播HIVの遺伝子学的均一性の推移

1999-2001年のシーケンスについて、V3各位のアミノ酸の出現頻度を算出し、さらに相同性を数値化しヒストグラムを描く。このアミノ酸出現頻度と相同性ヒストグラムについて、1988-93年と1996-1998年のものと比較検討予定である。

また、昨年度は、日本のHIV-1集団のうち垂直感染集団について解析を行ったが、今年度はその比較対象集団としてタイ国の垂直感染集団について解析した。

A. 研究目的

日本に蔓延しているHIV-1に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本のHIV-1について遺伝子学的・分子生物学的特徴を経年的に明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

以下の項目について年単位で追跡調査する。

(1) V3領域におけるJapanese Consensus Sequence (JCS)のGenotypeとPhenotypeの推移
感染者末梢血単核球よりDNAを抽出し、PCR法によりV3領域を増幅後、ダイレクトシーケン

(3) ウイルス分離率の推移

1988年より継続中である、日本のHIV-1感染者からのウイルス分離率の推移を経時観察中である。2000年は、236サンプルからウイルス分離を行っ

た。

(4) 超高感度RT活性測定法の確立

遺伝子学的薬剤耐性ウイルスの増加にも関わらず、ウイルス生物学的な活性の指標であるウイルス分離率が下がり続けていることを昨年度までに報告した。この現象の機序を明らかにする目的で酵素学的な薬剤耐性RT活性値を測定する。今年度は、前準備として、RT活性を高感度に測定する系を確立した。具体的には、既存の高感度RT活性測定法・AmpRT法を改良し、TaqManシステムとの融合により確立した。

C. 研究結果

(1) V3領域におけるJapanese Consensus Sequence (JCS)のGenotypeとPhenotypeの推移

2001年までのシークエンスと合わせて解析予定のため、今年度のデータは割愛する。

(2) V3領域における日本伝播HIVの遺伝子学的均一性の推移

バンコクのHIV-1感染妊婦30検体（母血液と臍帯血）について解析した。母親由来HIV-1はサブタイプEに属していた。HIV-1陽性臍帯血は5例確認でき、それらも全てサブタイプEに分類された。これらの解析をまとめると次のようになる。

集団でみた場合、日本の母親由来HIV-1集団は、様々なサブタイプ（A,B,D,E,G）が混在する雑多な集団であり、一方、児由来HIV-1も今のところ4つのサブタイプ（B,D,E,G）が確認され、やはり雑多な集団であった。一方、タイ国では母親・児由来HIV-1集団ともに、単一サブタイプEのみの均一集団であった。（図1）

多クローン解析により個々でみた場合、両国共に母親個体内のHIV-1はquasispeciesが強いものに対して、児体内HIV-1は、単一クローン傾向にある。（図2）これは諸外国での報告と同様の傾向である。

アミノ酸配列から予想されるco-receptor usageを見ると、予想可能な範囲では、すべてCCR5指向ウイルスであった（図2）。既に同様のデータがタイ国においてなされており、それを確認するデータだと言える。

(3) ウイルス分離率の推移（図3）

昨年度、1997年以降のウイルス分離率の低下傾向を報告したが、2000年もその傾向が持続している事を明らかにした。すなわち、ウイルス分離率はいまだ底値に達していない。

(4) 超高感度RT活性測定法の確立（図4）

新しい高感度RT活性測定法を確立した。これによると、ウイルス0.8copy相当量のRT活性を検出でき、既存のウイルスコピー数測定法より高感度であることが明らかになった。従来のRT活性測定法との比較は現在進行中であるが、文献的には1000~10000倍の感度と予想される。

D. 考察

タイ国のHIV-1垂直感染集団における遺伝子学的均一性に対して、我が国の顕著な多様性が明らかになった。これは、日本では、予防啓蒙活動の成果として邦人妊婦の感染者が少ない事に起因するものと思われる。すなわち、日本においては予防啓蒙活動が行き届かない海外からの旅行者あるいは移民者がこの集団のマジョリティを形成しており、それがために多くのサブタイプが流入しており、相対的に多様性が広がっている。

今回示されたように、遺伝子学的な多様性に依存せず、co-receptor usageが単一である点は興味深い。実際にヒトからヒトへ感染していくウイルスの正体は、恐らくはこのCCR5指向ウイルスが主体と考えられる。このウイルスは遺伝子学的にかなり保存されているという報告があることから、標的が絞られるという点でワクチン開発が大きく前進することが期待できる。

昨年度、ウイルス分離率が下がり続け、未だ底値に達していない点は、近年、他グループが報告している薬剤耐性ウイルスの増加と明らかに相反する現象であると報告し、われわれの対象についても薬剤耐性ウイルスの頻度について検討する必要があるとの宿題を自らに課した。今年度は薬剤耐性ウイルスの頻度について遺伝子学的アプローチではなく酵素学的アプローチを試みた。そのため、まず酵素学的な超高感度RT活性測定法を確立した。この方法を応用し薬剤耐性RT活性測定法を開発中である。これはすなわち薬剤感受性試験にも応用され、治療薬の選択という判断への重要な指標となりうると期待できる。

さらにこれもまた昨年度報告したように、ウイルス分離率の低下が反転上昇に転じた時こそが、薬剤耐性ウイルス伝播の脅威が現実的なものにな

る時期と考えられるため、今後もウイルス分離率及び測定可能になるであろう薬剤耐性RT活性を注意深く経過観察していく必要がある。現時点では薬剤耐性ウイルスが伝播していく可能性は低いと考えられる。

E. 結論

① 1996年以来持続しているウイルス分離率の低下傾向は2000年も継続しており、いまだ底値に達していない。

② 超高感度RT活性測定法を開発した。これによるとウイルス0.8copy相当量のRT活性を検出できる。

③ 日本のHIV-1集団のうち垂直感染集団について、昨年度までに得られた結果に加えて、比較対象としてタイ国の垂直感染集団を解析した。その結果、

a) 集団でみた場合、日本の母親由来HIV-1集団は、様々なサブタイプ (A,B,D,E,G) が混在する雑多な集団であり、一方、児由来HIV-1も今のところ4つのサブタイプ (B,D,E,G) が確認され、やはり雑多な集団である。一方、タイ国では母親・児由来HIV-1集団ともに、単一サブタイプEのみの均一集団である。

b) 多クローン解析により個々でみた場合、両国共に母親個体内のHIV-1はquasispeciesが強いものに対して、児体内HIV-1は、単一クローン傾向にある。

c) 両国共に、殆どの垂直感染ウイルスはCCR5指向ウイルスと推測された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) 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.

(2) 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* 2001;17: in press.

(3) **Nakasone T**, Takamatsu J, Watanabe K, Naganawa S, Someya K, Yoshino N, Kaizu M, Ohsu T, Takizawa M, Izumi Y, Kawahara M, Hara T, Fujimura Y, Yamada K, Nagai Y, Yamazaki S, and Honda M. Decline in the HIV-1 isolation rate in Japan: A 12 year observation. *Microbiol Immunol*. 2000;44(11): 949-952.

(4) Sasaki, Y., Y. Ami, **T. Nakasone**, K. Shinohara, E. Takahashi, S. Ando, K. Someya, Y. Suzuki, 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*. 2000;122:381-389.

(5) **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*. 2000;29:294

2. 学会発表

1. 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.

2. **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).

3. 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).

4. 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).

5. 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).

6. Katsuaki Shinohara, K. Sakai, E. Takahashi, Y. Ami, Y. Sasaki, N. Yoshino, Y. Suzaki, T. Nakasone, M. Honda. A pathogenic SHIV-C2/1-cynomolgus monkey model for evaluation of HIV vaccine candidates. The 13th International AIDS Conference (9-14 July 2000 Durban South Africa).

7. 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).

8. Hiroshi Yamamoto, Kazuki Katsuyama, Yukiko Nakada, Tadashi Nakasone, Yasushi Ami, Kouichi Shiosaki, Katsuaki Shinohara, Yasuyuki Eda, Youichiro Kino, Yukio Tokiyoshi, Eiji Takahashi, Yuriko Suzaki, 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).

9. 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).

10. 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).

11. 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)

12. 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)

13. 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)

14. 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)

15. 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-C2/1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）

16. 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）

17. 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. HIV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）

18. 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）

19. 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、Paijit 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

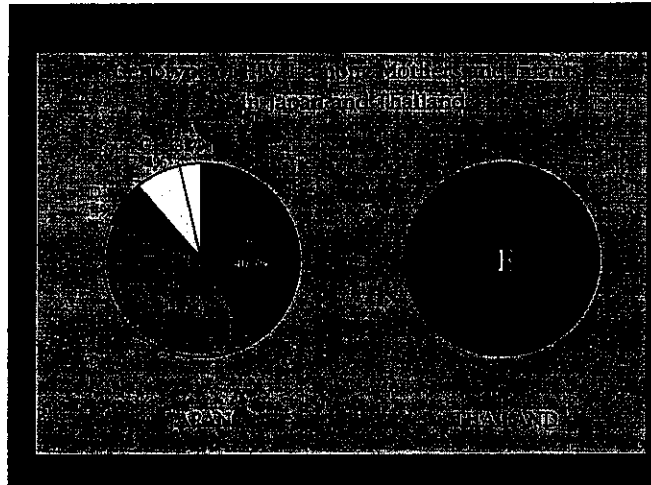
（2000.11/28-30 京都）

20. 長縄聡、相澤知恵子、佐藤成大、高橋清実、D.Nosssik、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）

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

1

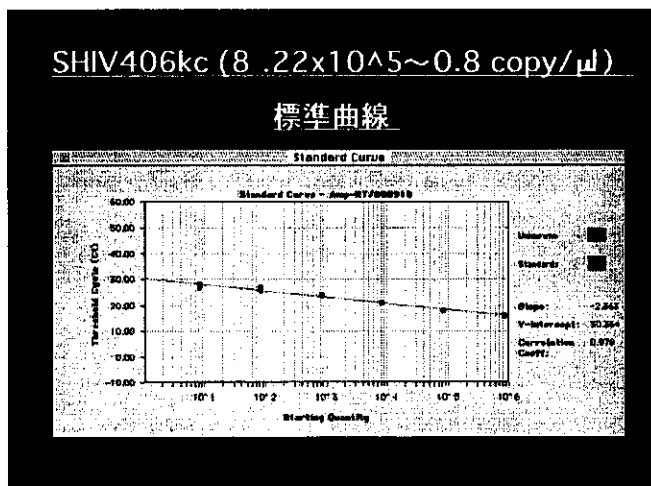


2

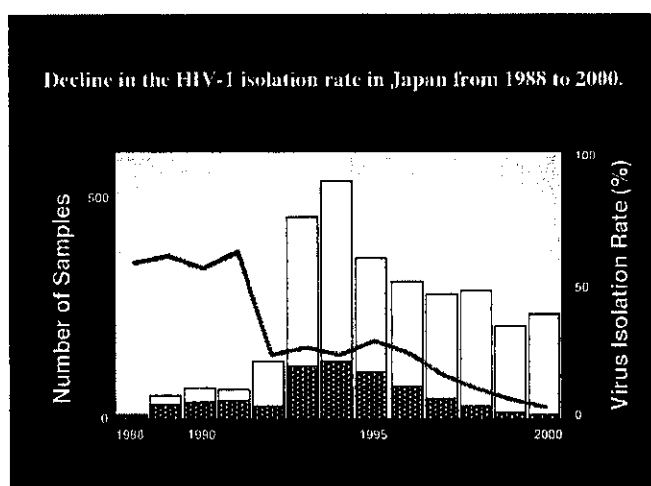
Amino Acid Sequence of V3 Region

Pair	member	Accession	Amino Acid Sequence of V3 Region	Number of	Conserved	Insertions/Deletions
Pair 1	member	M1-1	CTPSPNITKTSVHIGQGVFVYKIGLIGDRKAYC	43		Not predictable
	Accession	M1-2	K.S.R.R.T.L.....K.Q.R	43		Not predictable
	member	M1-3	43		CO2Rb
	Accession	M1-4	43		CO2Rb
	member	M1-5	43		Not predictable
Pair 2	member	M2-1	CTPSPNITKTSVHIGQGVFVYKIGLIGDRKAYC	43		CO2Rb
	Accession	M2-2	43		CO2Rb
	member	M2-3	43		CO2Rb
	Accession	M2-4	43		CO2Rb
	member	M2-5	43		Not predictable
Pair 3	member	M3-1	CTPSPNITKTSVHIGQGVFVYKIGLIGDRKAYC	43		CO2Rb
	Accession	M3-2	K.I.L.YR.....R.K.S.....R.S	43		Not predictable
	member	M3-3	43		CO2Rb
Pair 4	member	M4-1	CTPSPNITKTSVHIGQGVFVYKIGLIGDRKAYC	43		CO2Rb
	Accession	M4-2	43		Not predictable
	member	M4-3	43		CO2Rb
	Accession	M4-4	43		CO2Rb
	member	M4-5	43		Not predictable
Pair 5	member	M5-1	CTPSPNITKTSVHIGQGVFVYKIGLIGDRKAYC	43		CO2Rb
	Accession	M5-2	43		CO2Rb
	member	M5-3	43		CO2Rb
	Accession	M5-4	43		Not predictable
	member	M5-5	43		Not predictable

3



4



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

分担研究者 服部俊夫 東北大学 大学院医学系研究科感染症態学分野教授

研究要旨 BH-10 由来の V3 loop ペプチドは細胞膜に強く結合し、その結合をそれ自身が増すことにより感染を促進することを明らかにした。また gp41 の融合殻構造の出現と 2F5 エピトープの減少を gp41 由来ペプチドが抑制し、立体構造変化を抑制することを明らかにし、新たな感染阻止法考案の一助とする。

分担研究者 凌 虹、劉一
AIDS リサーチレジデント

1. 研究目的

- 1) HIV の env は細胞膜受容体への結合を担う gp120 と融合を担う膜貫通糖蛋白(gp41)よりなる。異なるウイルスの V3 ループに共通する機能を明らかにする為に、異なるウイルス株由来の V3 ループペプチドを用い、該当するウイルスの補受容体依存性の感染系で評価した。
- 2) HIV 感染において gp41 は立体構造を変化し、融合殻構造を形成する。我々はこの融合殻構造を認識する 50.69 抗体と立体構造変化を阻止する 2F5 抗体及び gp120 の V3 部位に対する抗体 902 を用いて、sCD4 による gp41 の立体構造の変化及び gp41 由来のペプチドの影響を検討した。

2. 研究方法

- 1) ペプチドを作成。HIV-1 IIIB (X4), ADA (R5), 89.6 (R5X4) 由来の V3 ループペプチドを作成した。V3-BH-10 のコントロールとして、二つのシステインをアラニンに置換し、ループ形成しない、V3-BH10/CA を作成した。また V3 BH10 由来のより短いペプチド NNT24 と IRI12 も作成した(Table1)。また樹脂上でビオチン基を導入 N 端ペプチドのみのビオチン化を可能にした Biotin-V3 ペプチド bio-BH10 と bio-CA と bio-ADA を作成した。gp41 由来のペプチド (C34 : aa 628-661; DP178: aa 638-673)。CXCR4 アンタゴニストである T140 (T22 誘導体: 藤井教授供与) をコントロールとして用いた。
- 2) 感染系で評価。Single round luciferase assay でおこなった。ルシフェラーゼレポーター遺伝子としては pNL4-3-E-R-を env 遺伝子 pSMHXB2 (X4),

pSMADA (R5), psp272-89.6 (R5X4) を使用した。レポーター遺伝子と env 遺伝子を 293T 細胞に共導入して、2 日後に上清を回収し、P24 抗原ウイルス量を捕えた。得たウイルスを標的細胞である、CD4 と補受容体を発現している U87 細胞に感染させ、entry の有無を 2 日後、細胞破碎溶液のルシフェラーゼ活性で測定した。

- 3) ペプチドの結合様式の検討 bio-BH10, -CA, -ADA が T 細胞, PBMC, U87, U87.CD4, U87.CD4.Co-R などへ結合する事を PE-streptavidin で検出し、FACS を用い解析した。またその細胞結合をプロテアーゼインヒビター (PI) で抑制できるか否かの競合実験を CEM.CCR5 あるいは SupT1 を使用し行った。さらに感染細胞(H9/IIIB)を用いて sCD4 による gp120/gp41 の立体構造変化を Anti-gp41 mAbs (50.69 と 2F5 抗体)を用いて検討した。gp41 由来のペプチド (C34 : aa 628-661; DP178: aa 638-673) の影響を two color FACS analysis を用いて解析した。その際に Anti-gp41 mAbs (50.69 抗体と 2F5 抗体)を PE-streptavidin, Anti-gp120 mAb (902)を FITC でラベルした。

3. 研究結果

- 1) V3 ペプチドの HIV-1 感染促進作用。種々の V3 ペプチドあるいは T140 を HXB2/Luc に共存させて U87/CD4/CXCR4 に感染させると、T140 は感染を抑制したが、V3-BH10 と V3-BH10/CA は用量依存的 (10 nM- 10 μ M) な感染促進作用を示し、最大の感染促進は 10 μ M でみられ、それは 93.6%、88.2%であった (図 1A)。V3-89.6 と V3-ADA の HXB2/Luc 感染への促進作用は殆ど見られなかった。ADA/Luc 感染においては、V3-ADA, V3-89.6

は感染促進作用を示したが (図 1B)。89.6/Luc 感染に U87.CD4.CXCR4 と U87.CD4.CCR5 へ V3-89.6 は感染促進作用を示したが (Fig. 1 C, D)。V3-NNT24 も同程度の 感染促進作用を示したが V3-IRI12 は感染促進作用を示さなかった。ペプチドを U87.CD4.CXCR4 あるいは U87.CD4.CCR5 で前処理し、洗浄し除去した後、HXB2/Luc or ADA/Luc にて感染させると、同様な促進作用を示した。

- 2) Bio-V3BH-10 の細胞結合と結合促進作用。bio-BH10 と bio-CA はともに種々細胞表面に結合した。bio-ADA には有意な結合はみられなかった。IRI12 以外の V3 ペプチドは bio-BH10 の細胞への結合を促進した (図 2)。
- 3) BPTI とアプロチニンの bio-BH10 細胞表面結合阻止作用。6 種の異なるプロテアーゼインヒビターを用いると、トリプシンとキモトリプシンの両方を抑制する BPTI とアプロチニンのみが bio-BH10 の結合を阻止した (図 3)。
- 4) sCD4 の作用。可溶性 CD4 を H9/IIIB 細胞に添加すると、50.69 抗体の H9/IIIB への結合が増加するに対し、2F5 抗体と 902 抗体の結合は減少した。そしてこの変化は gp41 由来のペプチドにより阻止された (図 4)。
- 5) Gp41 由来ペプチドの 2 色解析。DP178 は gp120+50.69-cells から gp120-50.69+cells への変化を、C34 は gp120+2F5+cells から gp120-2F5-cells への変化を阻止した (図 5)。

4. 考察

異なるウイルス由来の V3 ループペプチドはそれぞれのウイルス特異的に感染促進作用を示した。この感染促進作用の理由は不明ではあるが、Biotin-V3-BH10, CA が細胞膜表面に結合していることと関連していると思われる。gp41 由来のペプチドは sCD4 による gp41 の conformation change を阻止していることが示唆された。

5. 結論

- 1) V3-BH10 は補受容体や CD4 抗原を欠く細胞を

はじめ種々の細胞に結合し、その結合は V3-BH10 自身ばかりでなく、linear ペプチドによっても誘導されたが、V3-ADA や V3-89.6 には抑制されなかった。

- 2) 同様にそれぞれの V3 ペプチドは由来ウイルス感染を促進した。
- 3) この結合には細胞表面のプロテアーゼ活性が感染に関与していることを明らかにした。
- 4) 感染細胞膜表面の gp41 は様々な構造をしていることが明らかになった。
- 5) 可溶性 CD4 による立体構造変化は gp120+50.69-, 2F5+ の細胞群が gp120- 50.69+2F5- 群に変化し、T20 はその変化を抑制することが明らかになった。

論文発表

1. Hattori T, Komoda H, Pahwa S, et al.: A decline of anti-DP107 antibody associates with clinical progression. *AIDS* 12:1557-1559, 1998.
2. Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T.: T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J. Virol* 72:9763-70, 1998.
3. Zhang X, Iwatani Y, Shimayama T., Yamada R., Koito A., Xu Y., Sakai, H., Uchiyama T., and Hattori T.: Phosphorothioate hammerhead ribozymes targeting a conserved sequence in V3 loop region inhibit HIV-1 entry. *Antisense & nucleic acid development*. 8:441-450, 1998.
4. Tamamura H, Arakaki R, Nakashima H, Zhang X, Fujii N, Uchiyama T, Hattori T.: An enhancement in the binding ability of tachyplesin analogues to CXCR4 brought out a marked increase in anti-HIV activity as well as inhibitory activity against HIV entry mediated by CXCR4 *AIDS Res. and Hum. Retrovir*. 15:419-427, 1999.
5. Zhang X., Xu Y., Ling H., and Hattori T. Inhibition of infection of incoming HIV-1 virus by RNA-

cleaving DNA enzyme. FEBS Letters 458: 151-156, 1999.

6. Taniguchi Y., Zolla-Pazner S., Xu Y., Zhang X, Takeda S, and Hattori T. A Human Monoclonal Antibody (98-6) Reacts with the Fusion Active Form of gp41. Virology. 273 (2):333-340, 2000.
7. 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 lett. 487:185-188, 2000.
8. 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.

学会発表

1. Hattori T., Komoda H, Pahwa S, Tateyama M, Zhang X, Xu Y, Uchiyama T. Natural antibody responses against two distinct α -helical regions in gp41. US-Japan Cooperative Medical Science Program, Hyatt Regency Suites, Palm Springs CA, March 18-20, 1998 Williamsburgs, VA.
2. Hattori T., and Zolla-Pazner S. HIV-1 gp41の活性化融合構造に対する液性抗体反応。第28回日本免疫学会 シンポジウム6 エイズ 神戸、1998年12月2-4日。
3. 徐又農、張曉燕、内山卓、服部俊夫：HIVのgp41由来のペプチドの構造と感染抑制機構。第28回日本免疫学会総会、国際免疫シンポジウム、神戸、1998年11月30-12月6日。
4. 徐又農、張曉燕、内山卓、服部俊夫：HIVの膜貫通タンパク gp41 由来のペプチドの抑制機構の検討。第46回日本ウイルス学会総会、東京、1998年10月12-14日。
5. Hattori T., Taniguchi Y, Xu Y, Zhang X, Takeda S, Zolla-Pazner S. Characterization of a human monoclonal antibody (98.6) that reacts with the

conformational epitope of N36/C34 of gp41. US-Japan Cooperative Medical Science Program, March 23-27 Toyama, Japan 1999.

6. 谷口裕子、武田哲、藤田温子、徐又農、張曉燕、服部俊夫：HIV-1 gp41 の活性化融合殻構造に対する抗体の特性。第12回日本エイズ学会 東京、1998年12月1-2日。
7. Hattori T., Taniguchi Y, Xu Y, Takeda S, Zhang X, Ohno I, Zolla-Pazner S. A human monoclonal antibody (98-6) reacts with the fusion active form of gp41 Cold Spring Harbor Laboratory Sept. 22-26, 1999.
8. 服部俊夫、谷口裕子、武田哲、徐又農、張曉燕、松岡雅雄 融合殻構造を認識する 98-6 抗体の種々のウイルス膜抗原への反応 第47回 日本ウイルス学会 横浜 1999年11月7-9日
9. Hattori T., Zolla-Pazner S. Human monoclonal antibodies against fusion active core structure. 5th Asia-Pacific rim conference on infectious diseases Jan 7-10, Chennai, India, 2000.
10. 凌虹、劉一、服部俊夫：V3 ループの標的細胞特異性の感染促進作用。第48回日本ウイルス学会。津市。2000年10月12日—14日。
11. Ling H., Hattori T. V3 loop derived peptides enhance HIV-1 entry into the corresponding target cells.第30回日本免疫学会総会、仙台、2000年11月14-16日。
12. 劉一、凌虹、服部俊夫：抗 HIV gp41 モノクロナル抗体の X4, R5 ウイルスに対する中和活性 第75回日本感染症学会総会、奈良、2001年3月。
13. Ling H, Zhang X., Liu Y., Hattori T.. V3 loop peptides enhance their own binding to cells and infection of HIV-1. 第13回日米エイズ部会合同会議、熊本、2001年3月21日—23日。

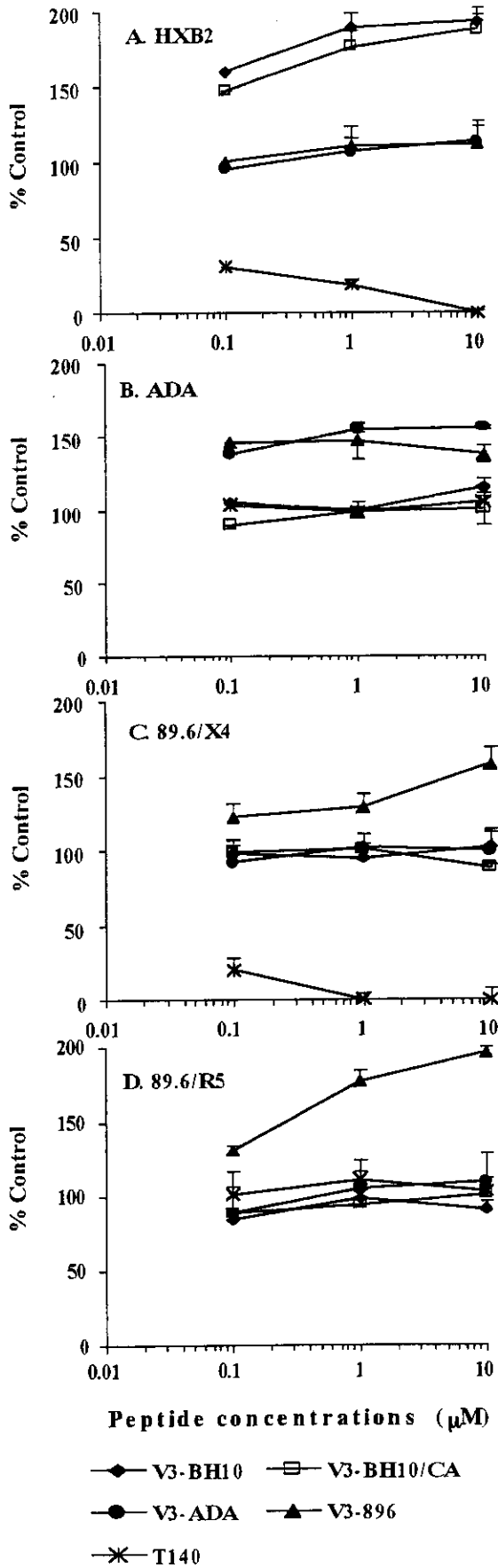


Fig. 1 The enhancement of HIV-1 infection by V3 peptides.

Table 1 The amino acid sequences of the V3 peptides

Peptides	Sequence
V3-BH10	EINCTRPNNMTRKSIIRIGRQPRAFYTIKIGNMRQAHCHIS
V3-BH10/CA	-----A-----A-----
V3-89.6	ESVY-----RRLS-----YARRN-I-D-I-----
V3-ADA	-----H-----Y-T-E-I-D-I-----
V3-NNT24	-----
V3-IR112	-----

The spaces represent absence of amino acid, and dashes represent identical with V3-BH10.

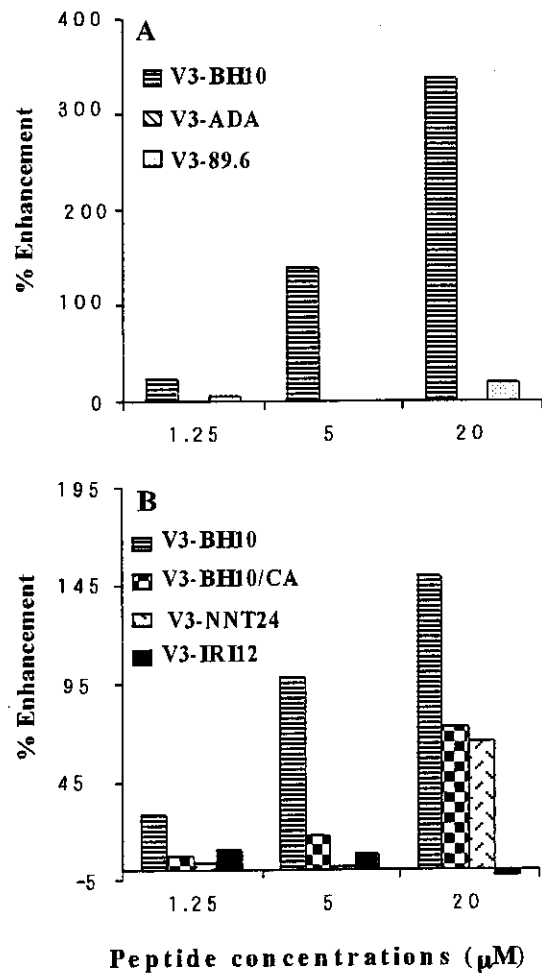


Fig. 2 The enhancement of bio-BH10 binding to SupT1 cells by non-labeled V3 peptides.