

Fig. 3 The effect of PI on bio-BH10 binding to different cells.

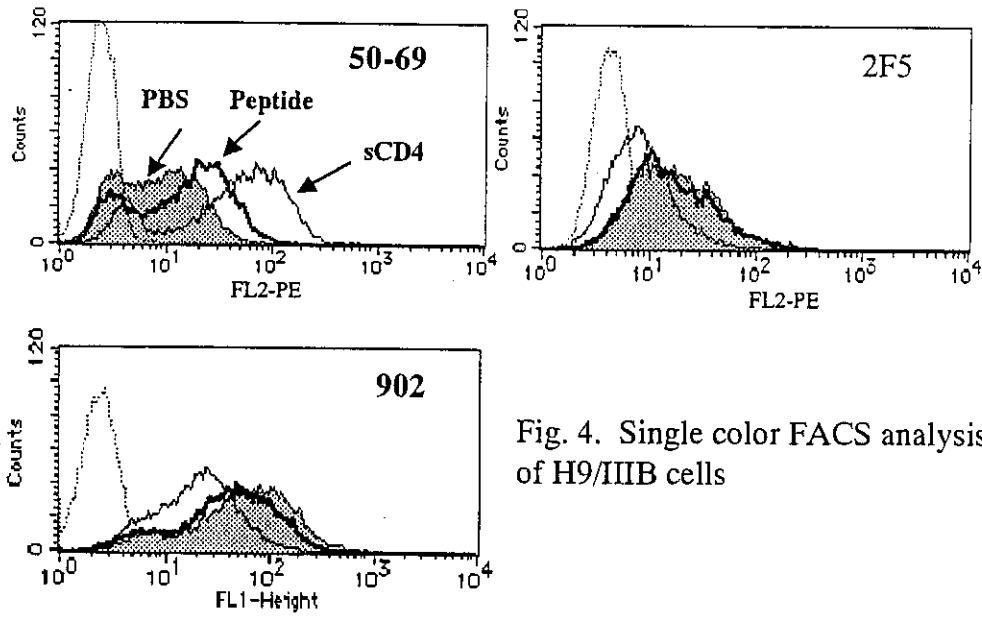


Fig. 4. Single color FACS analysis of H9/IIIB cells

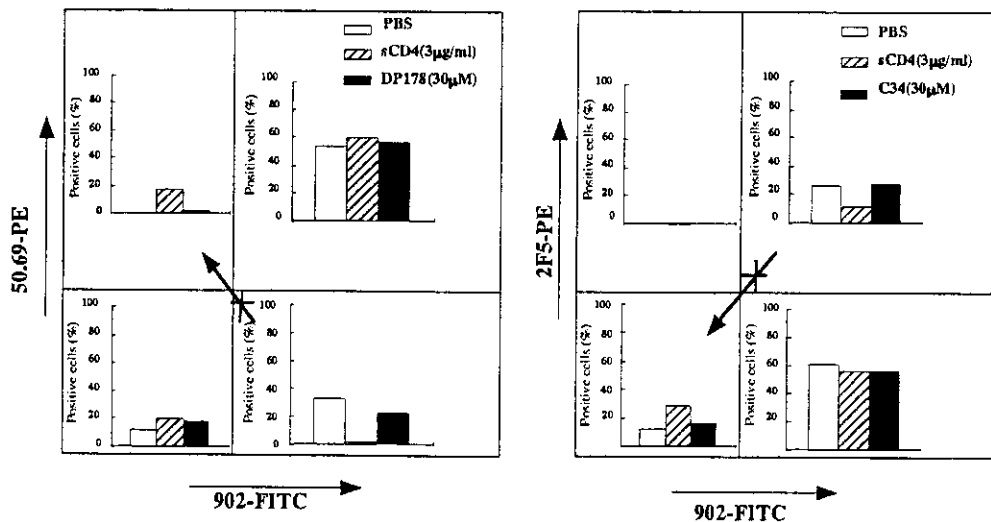


Fig. 5. Two color FACS analysis of H9/IIIB cells by anti-gp41 mAbs (50.69, 2F5) and anti-gp120 mAb(902)

細胞表面においてHIV-1感染を修飾する因子の解析

分担研究者 原田信志 (熊本大学医学部感染防御)

研究要旨 HIV-1の感染を修飾(増強あるいは抑制)するヒト細胞由来の因子の解析を試みた。幾つかの細胞培養上清中に、特にT細胞に、HIV-1の感染を促進する因子が産生されていることが示唆された。この因子はウイルス感染の吸着以降の過程で作用していたが、LTRを介した増強ではなかった。さらにHTLV-I感染細胞でこの因子の高い産生が認められたが、Tax以外の何らかの因子の関与が示唆された。これらの因子の生体内での存在は不明であるが、病態への関与は否定できないと思われた。

A. 研究目的

T細胞指向性HIV-1(X4)のレセプターはCD4とCXCR4であり、マクロファージ指向性ウイルス(R5)はレセプターとしてCD4とCCR5を使用する。両指向性HIV-1(R5X4)はCXCR4とCCR5を共に利用し感染を成立させる。そのほか、神経細胞や腸上皮細胞ではガラクトシールセラマイドがHIV-1感染のレセプターとして利用されている。HIV-1はこのように複雑なレセプター系を使用しているが、この多様なレセプターが感染成立にどのように機能的に関連しているのか、レセプターを介して感染を左右する因子は生体内に存在するのか、など疑問は多い。

我々はこれまで二つのアプローチでウイルスのレセプターと感染の問題を解析してきた。その一つはCCR5のリガンドでありR5ウイルスの感染を阻止するMIP-1 α に耐性のウイルスを作製し、その変異部位を解析することにより、ウイルス側のレセプター反応部位を決定する事である。もう一つの方法として、様々な糖脂質を使いHIV-1感染の修飾(抑制あるいは促進)機構を解析することを試みた。

これまで植物由来の糖脂質を使用しHIV-1の感染修飾を解析し報告してきたが、同様の感染修飾因子が生体内、あるいはヒト由来の細胞にも存在するか今回検討した。

B. 研究方法

1. 細胞とウイルス: ウイルスはpNL-luc DNAとエンベロープにNL4-3(X4)、JR-FL(R5)、MLVそれにVSV-Gを付加したpseudotyped virusを作製し使用した。MAGI/CCR5細胞に感染させルシフェラーゼ活性を測定することにより、そのウイルスの感染価として評価した。

2. 細胞上清: HTLV-I由来の細胞としてMT-2、MT-4、LCL-Kan、IZ-86を、T細胞由来としてHUT-78、H9、PM-1、Jurkat、MOLT-4、CEMを、B細胞由来としてBCBL-1、Namalwa、Daudi、Akata、P3HR-1、BJA-B、Ramosを使用した。またmyeloid系としてK562、U937を用いた。それぞれ7日目の培養上清を採取し、50%の濃度で実験に使用した。
3. 感染細胞の同定: HIV-1のレセプターを介した感染系では、MAGI/CCR5細胞を用いて感染細胞をX-galで染色した。
4. TPA: NF κ Bを介したHIV-1の感染増強の陽性コントロールとして、0.2と0.5 μ g/mlで使用した。
5. 細胞表面ウイルスレセプターの解析: CD4、CXCR4、CCR5に対するモノクローナル抗体を使用し細胞を染色し、FACS解析した。

(倫理面への配慮はこの研究では必要ない。)

C. 研究結果

1. 細胞由来のHIV-1感染修飾因子を追究するため、それぞれの細胞株培養上清を50%の濃度で作用させた(図1)。4種類のエンベロープを有したpseudotyped virusesをMAGI/CCR5細胞に感染させ3日後にルシフェラーゼ活性を測定した。一般的にT細胞由来の細胞株上清が、B細胞やK562、U937細胞由来上清に比べて、ウイルス感染増強作用が強かった。しかし、B細胞であるBJA-Bは例外であった。この上清による感染増強はHIV-1のX4(図1A)、R5(図1B)、MLVエンベロープ(図1C)、VSV-G(図1D)を有したウイルスで共通に観察された。このことは、この感染修飾がレセプターの

レベルで起こっているのではないことを示唆していた。

同様の感染修飾はMAGIアッセイでも確認され、pseudotyped virusの影響ではないと考えられた。

2. この感染増強効果はHTLV-I感染細胞に限られたものではないが、HTLV-I由来の細胞株培養上清で特に強く観察された。そこで、HTLV-Iウイルス粒子そのものにこの作用があるかどうか調べるため、MT-2細胞培養上清からsucrose密度勾配遠心法でウイルスを精製した。HIV-1感染増強作用はHTLV-I粒子及びその粒子を除いた上清にも認められた。この事は、HTLV-I関連感染増強因子はHTLV-I粒子表面と培養上清中に遊離した形で存在すると思われた。
3. HTLV-IのTaxに対する抗体(1t-4)で処理すると、MT-2上清やHTLV-I粒子による感染増強は、部分的に抑制された。従って、Tax以外の因子の存在も否定できなかった。
4. MT-2細胞培養上清処理では細胞表面マーカであるCD4、CXCR4、CCR5の発現に差が認められなかった。また、ウイルスの吸着量にも影響を与えなかった。
5. 培養上清による感染増強がLTRを介したのか調べるため、pNL-luc DNAをトランスフェクトし上清を作用させ、そのLTRを介したluc遺伝子の発現への影響を調べた。図2に示すように、TPAではlucの発現は増強されるが、上清ではそのような作用は認められなかった。

D. 考察

これまで植物由来の糖脂質（カプシアノサイドG等）を使用しHIV-1感染に与える作用を調べてきた。ヘパランサルフェイトなど糖脂質類似物質でも同様であるが、細胞を前処置しウイルスを感染させると感染の増強が認められた。カプシアノサイドGの大きな特徴はこの糖脂質がHIV-1タイプ特異的効果を持っていることであった。カプシアノサイドGによるX4ウイルス特異的感染増強作用は、CD4とCXCR4とが細胞膜表面で共集合するためであることを示した。このように細胞膜上での分子（レセプター）の動きが、ウイルスの感染を左右することがわかった。今回、本研究では、似たような作用を持つ因子が生体内に存在するか、あるいはそのような因子がヒト由来の細胞で産生されているかを追究することを目的とした。

様々なヒト由来培養細胞株を使用し、その培養7日目の上清を採取し、HIV-1感染への影響を調べた。一般的にT細胞株でウイルス感染増強を促す因子が多く産生されていると思われた(図1)。しかし、これらのスクリーニングの結果から；1) 同じT細胞株でもHTLV-I由来の細胞で感染増強活性が高かったことから、HTLV-I関連蛋白がこの因子である可能性、2) 様々なエンベロップを有するpseudotyped virusesを感染させると全て類似の増強効果が認められたことから、この感染増強効果はレセプターへの吸着以降の問題である可能性、が示唆された。

HTLV-IのTaxはHIV-1 LTRを介してHIV-1の感染を促進することが報告されている。そこで、我々もMT-2細胞培養上清とTaxに対するモノクローナル抗体を使って感染増強抑制実験を行った。HTLV-I粒子及び細胞上清によるHIV-1感染増強はこの抗体では完全に抑制できなかった。さらに、この上清はHIV-1のLTRを介した遺伝子発現の増強を促さなかったことから(図2)、Taxの作用を完全に否定はできないものの、他の因子が存在するものと思われた。HTLV-I感染細胞は多くのサイトカインを産生していることが知られている。しかし、TNFやIL-6等、ほとんどがLTRを介した感染増強である。HIV-1 LTRを介さないこれら増強因子は、ウイルスのレセプター吸着以降に作用することが示唆されるが、さらに詳しい解析と因子の分離が必要である。

様々な生体因子がHIV-1の感染を修飾することはHIV-1の感染動態を考えるうえで重要である。今回、残念ながら、HIV-1の感染を抑制するような因子の発見には至らなかった。現在、樹状細胞表面に存在しHIV-1の保持に重要な役割を担っていると報告されているDC-SIGNの精製を行っている。このような生体因子は、HIV-1の粘膜感染防御に作用する可能性があり、今後さらにウイルス学的解析を加えて行く予定である。

E. 結論

様々なヒト由来培養細胞株の培養上清にHIV-1の感染を修飾（増強あるいは抑制）する因子がないか調べた。T細胞、特にHTLV-I感染細胞でHIV-1の感染を促進する因子が検出された。ウイルス吸着以降に作用するが、LTRを介する増強ではなく、Tax以外のなんらかの因子が関与していると考えられた。

F. 研究発表

〔論文発表〕

1. Maeda, Y., Foda, M., Matsushita, S. and Harada, S.: Involvement of both the V2 and V3 regions of the CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope in reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein 1 α . *J. Virol.*, 74, 1787-1793 (2000).
2. Tempaku, A., Maeda, Y., Song, W. and Harada, S.: Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I) Tax is not the only one factor to enhance human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) infection in culture-supernatants. *Virus Genes*, in press.

〔学会発表〕

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。
5. Mohamed Foda, Shinji Harada, Yosuke Maeda ; Role of variable domains on a dual tropic HIV-1 envelope gp120 in CCR5 coreceptor utilization, 第14回日本エイズ学会総会、2000年12月、京都。
6. Wei Song, Yosuke Maeda, Keisuke Yusa, Yuetsu Tanaka, 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12月、京都。

E. 結論

今後さらに研究を進めることにより、VprによるG₂/M arrestの誘導メカニズムの詳細が明らかになるとと思われる。Vprの作用機序に関する本研究および今後の研究の成果は新たな抗HIV療法の開発に向けた基礎技術の開発につながるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nagai, Y., Masuda, M., Oshima, N., Tanaka, K., Yamada, T., Iwamoto, A., Okayama, H., and Masuda, M. Hyperphosphorylation and Rad24-dependent increase of Wee1 associated with HIV-1 Vpr-induced G₂/M arrest in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. (投稿準備中)

2. 学会発表

(1) Nagai, Y., Masuda, M., and Masuda, M. Nuclear accumulation of WEE1 associated with cell cycle arrest induced by HIV-1 Vpr. The Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, May, 2000.

(2) 永井 由紀子, 増田 道明. HIV-1 Vprによる宿主細胞周期異常の発現機構 - 分裂酵母を用いた研究. 日本レトロウイルス研究会第3回夏期セミナー, 茨城県岩間町, 平成12年8月.

(3) 増田 道明, 永井 由紀子. HIV-1 VprによるG₂/M arrestの誘導機構に関する研究. 日本ウイルス学会第48回学術集会, 三重県津市, 平成12年10月.

図1 様々な細胞株培養上清（50%）の pseudotyped viruses 感染への影響。

(A) NL4-3、(B) JR-FL、(C) MLV、及び (D) VSV-G 蛋白のエンベロープを有したウイルスを使用した。MAGI/CCR5 細胞へ感染後3日目、ルシフェラーゼ活性を測定し、それぞれのウイルスの感染価とした。

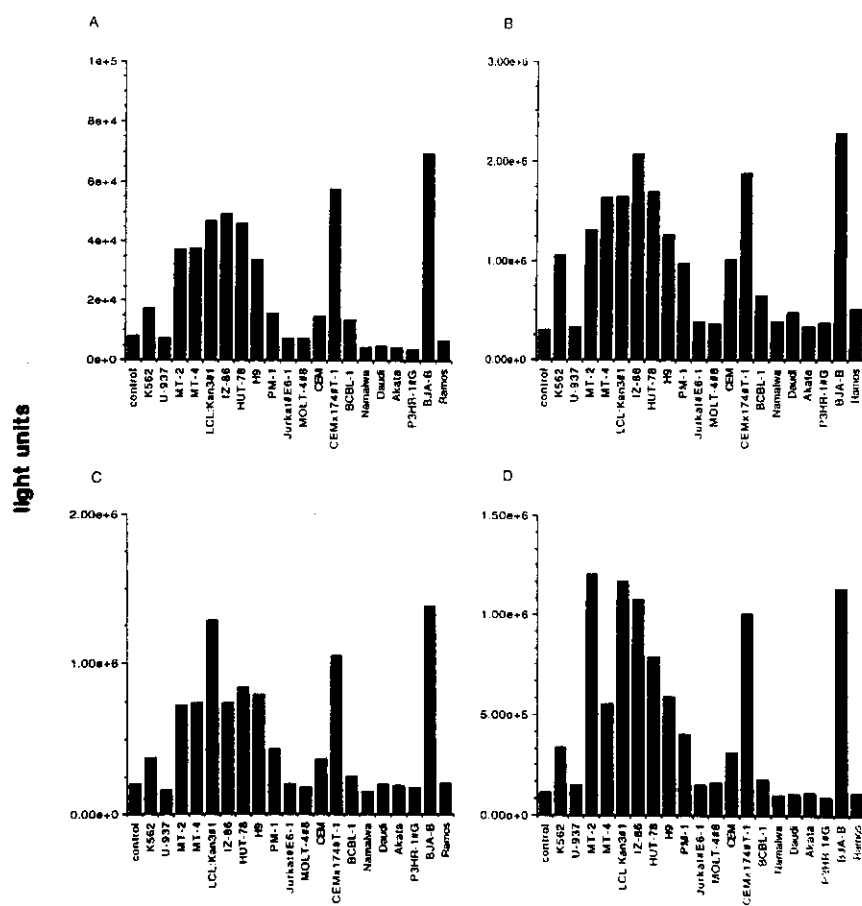
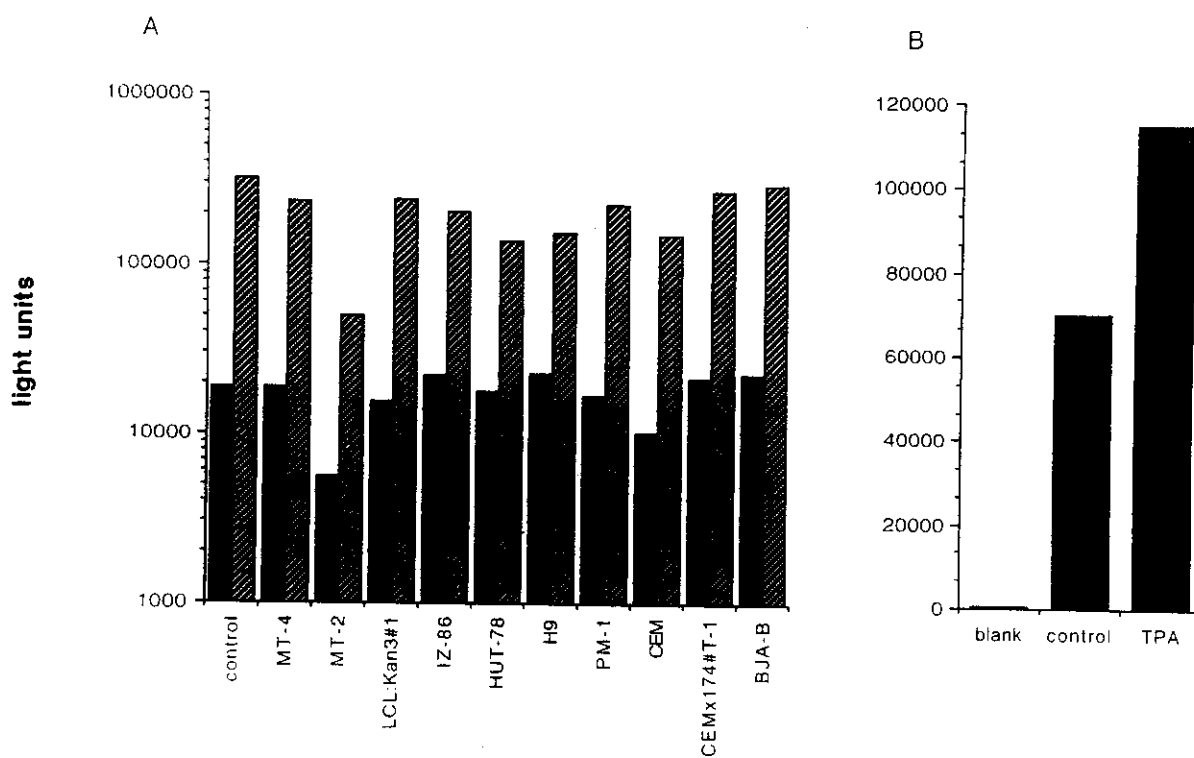


図2 (A) 培養上清 (50%) のトランスフェクトされた HIV-1 DNA (pNL-luc) への作用。DNA 量は 2×10^4 MAGI/CCR5 細胞に対し 0.2 μ g (shaded bar) と 0.5 μ g (hatched bar) を使用した。
 (B) コントロールとして、培養上清のかわりに、1.0 ng/ml の TPA を使用した。トランスフェクトした DNA 量は 0.5 μ g/well である。



Vpr による宿主細胞周期のかく乱機構に関する研究

分担研究者 増田 道明 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨 HIV-1 Vpr の発現により細胞周期制御宿主蛋白の一つ Wee1 のリン酸化が促進されることが明らかになった。また、リン酸化された Wee1 が他の宿主因子 Rad24 依存的に安定化することも示唆された。Wee1 の発現様式のこのような変化が Vpr による細胞周期かく乱をもたらしている可能性がある。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) のアクセサリ一蛋白 Vpr は宿主の細胞周期を G₂/M 期で停止 (arrest) させるが、この機能はウイルス産生に対して促進的に働くと考えられている。以前の研究から、Vpr による G₂/M arrest の誘導には宿主因子 Wee1 が必要であることが示されている (Masuda et al., 2000)。本研究は、ヒトの細胞周期研究における有用なモデルである分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて、Vpr が Wee1 の発現様式に与える影響を解析し、Vpr による宿主細胞周期のかく乱機構を解明することを目的としている。

B. 研究方法

本来の Wee1 の代わりに His 標識および HA 標識のついた Wee1 蛋白 (His-HA-Wee1) の産生可能な *S. pombe* の人為的変異株 (豪州メルボルン大学 O'Connell 博士より分与) に、pREP1-vpr (チアミンの除去により Vpr の発現誘導可能なプラスミドベクター) あるいはコントロールの空ベクター pREP-1 を導入し、形質転換株を得た。また、エイズ患者由来の HIV-1 の vpr 遺伝子 (東大・医科学研究所 山田博士、岩本博士より分与) を pREP-1 に組み込んだベクターを導入した株も得た。His-HA-Wee1 産生株に rad24, ppa2, chk1, cds1 などの遺伝子欠損を導入した変異株にも pREP1-vpr あるいは pREP-1 を導入し、形質転換株を得た。これらの形質転換株をチアミン非存在下で培養し、cdc phenotype の有無により細胞周期への影響を観察し、抗 HA 抗体 (12CA5) を用いたウェスタン法により Wee1 の発現を解析した。

C. 研究成果

Vpr の発現による G₂/M arrest の誘導に伴い、Wee1 の hyperphosphorylation および増加が認められた (図 1)。患者由来の Vpr の比較により、G₂/M arrest 誘導能と Wee1 の hyperphosphorylation には相関が見られた。rad24 欠損株では、Vpr による G₂/M arrest は見られず、Wee1 の hyperphosphorylation は認められるものの、増加は認められなかった。一方、ppa2 欠損株ではやはり Vpr による G₂/M arrest は見られないが、Wee1 の hyperphosphorylation や増加は認められた。chk1 や cds1 の欠損株では、Vpr の発現による G₂/M arrest、Wee1 の hyperphosphorylation や増加がいずれも認められた。

D. 考察

Vpr の発現により hyperphosphorylation された Wee1 が、Rad24 依存的に安定化する可能性が示唆された。Rad24 はヒトの 14-3-3 ファミリー蛋白のホモログであるが、ヒトの細胞においては 14-3-3β が WEE1 の C 末

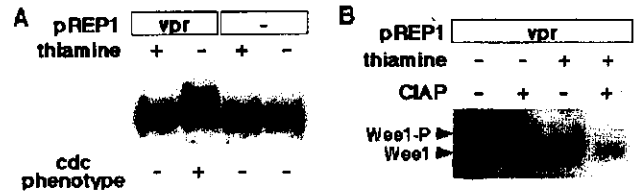


図 1. (A)チアミン非存在下での培養により G₂/M arrest を意味する cdc phenotype が出現し、それに伴い Wee1 の分子量や発現量の増加が見られた。(B)アルカリホスファターゼ (CIAP) の処理により分子量が低下することから、Vpr の発現により Wee1 は hyperphosphorylation を受けている (Wee1-P) ことがわかった。

リン酸化部位に結合し、WEE1 の分解を抑制することが最近報告された (Wang et al., 2000)。同様の機序が Vpr による G₂/M arrest に関与している可能性もある。Wee1 のリン酸化能を有する蛋白として Chk1 や Cds1 が報告されているが、Vpr の発現に伴う Wee1 の hyperphosphorylation にはこれらの宿主因子は不要であった。従って、他の kinase が関与している可能性が高い。一方、protein phosphatase 2A (PP2A) の触媒サブユニットである Ppa2 は Vpr による G₂/M arrest に必須であるが (Masuda et al., 2000)、Wee1 の hyperphosphorylation や増加には不要であった。従って PP2A は Wee1 の下流あるいは Wee1 以外の経路を通じて G₂/M arrest の誘導に関与していると考えられる。G₂ 期から M 期への移行を促す CDC2 は WEE1 と CDC25 の活性の相対的な関係で制御されると考えられている。従って PP2A は CDC25 の活性に影響を与える可能性もある。すなわち、Vpr は Rad24 (すなわち 14-3-3) を介して WEE1 の活性を高め、PP2A を介して CDC25 を抑制するという両方の経路を通して CDC2 を不活化し、G₂/M arrest を誘導するというモデル仮説も考えられる (図 2)。

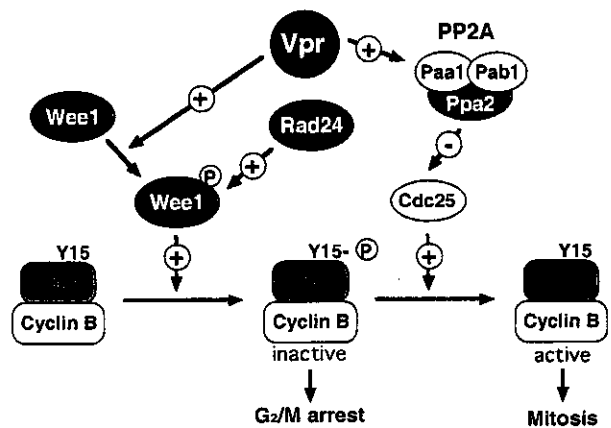


図 2. Vpr による G₂/M arrest 誘導機構のモデル仮説。

gp41細胞質内部分の構造機能関連

分担研究者 松田善衛 国立感染症研究所エイズ研究センター第三室室長

研究要旨

HIV-1 エンベロープ蛋白質複合体の一つである gp41 (TM) は膜融合の際の中心的分子である。

gp41 はその細胞質内部分が約 150 アミノ酸の長さを持ち種々の生物学的活性を担っていると考えられている。この部分には多数のアルギニン残基が見いだされ、存在が推測されている2つの amphipathic helices (N 末側からそれぞれ segment II, segment I とよぶ) の構成に寄与している。今回はこれらのアルギニン残基を部位特異的変異導入法によってグルタミンに置換して、エンベロープ分子のウイルス粒子上への取り込みに対する影響を調べた。その結果個々のアルギニン単独の変異ではエンベロープ分子取り込み上顕著な表現型の変化が得られなかったが、segment II の途中でのストップコドン導入あるいはフレームシフト変異の導入によってエンベロープ蛋白質の膜表面への運搬の異常が見られることがわかった。

A 研究目的

レンチウイルスのエンベロープ蛋白質複合体のうちの TM 部分はウイルス感染の際の膜融合において中心的役割を果たすことが知られているが、その細胞質内部分は C 型レトロウイルスなどと比較しても特徴的に長くレンチウイルス特有の生物学的機能を担っていると考えられている。(Fig.1) たとえばエンベロープ蛋白質の細胞内輸送、マトリックス蛋白質との相互作用を介してのエンベロープ蛋白質のウイルス粒子上への取り込みなどが同部分を介する機能であることが示唆されてきている。TM 細胞質内部分は蛋白化学的に見ると多数のアルギニン残基を有し、二つの非常に強い amphipathicity を持つヘリックスの存在が推定されている。しかしその amphipathic helix のエンベロープ蛋白質の細胞質内分布やウイルス粒子へのエンベロープ取り込みなどに対する寄与についてはまだ十分に理解されていない。またこれらの現象の基盤となるエンベロープ蛋白質、マトリックス蛋白質、細胞膜および細胞内蛋白質群との立体的相互配置は未知のままである。今回これらの知見を得る目的の第一歩としてアルギニン残基のグルタミンによる置換体を作成しそれらについて解析を加えた。

B 研究方法

HIV-1 分子クローンとしては clade B, CXCR4 tropic molecular clone の一つである HXB 2 株を使用した。今回変異体作成の対象となる gp41 細胞質内部分は一部必須遺伝子 rev と重複するため gp41 変異体を作成することによって Rev 蛋白質にも変異が加わってしまいその解析が困難になること

が予想された。そのためまず rev の開始コドンを変異させ本来の Rev 蛋白質の発現をなくした後、あらためて rev cDNA を nef 領域に組み込んで Rev を発現させるようにした (Fig.2)。これによって Rev に対する影響無く gp41 部分の変異が導入できるようにした。変異体導入は PCR-mediated mutagenesis による。まずアルギニン残基を構造的には保存的なグルタミン残基に置換した。置換部位は 770, 772, 780, 787, 788 番目 [segment II 内]、および 828, 838, 841, 845, 846, 848 番目 [segment I 内] である。それぞれの変異体プロウイルス DNA を COS 細胞に electroporation によって導入し cell lysates, virus lysates を作成しその protein profile を immunoblotting によって解析した。またいくつかの変異体については Env の細胞内および細胞表面発現をエンベロープに対するモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法によって解析した。

C 研究結果

個々のアルギニン残基のグルタミン残基への置換ではエンベロープ蛋白質の発現、ウイルス粒子への取り込みなどについて野生型と比較して有意な表現型の変化を認めなかった。この変異体作成の過程で得られた segment II 領域内でのストップコドン変異体 (777stop) および 786 番目のアミノ酸でのフレームシフト変異体 (786fs) においては著名なウイルス粒子上へのエンベロープ蛋白質の取り込み低下が見られた。(Fig.3) 免疫蛍光抗体法による測定ではこれらの変異体では細胞内でのエンベロープ蛋白質発現は保持されていたが、細胞表面への発現は顕著

に低下していた (data not shown)。これらの結果は以前の他の研究者たちの実験結果と一致し segment II がエンベロープ蛋白質の細胞内輸送に関与していることを示唆するものである。この結果に基づいて現在 segmentII 領域のより広範な変異体を作成中である。

D 考察

g p 4 1 細胞質内部分に存在するアルギニン残基は想定される二つの amphipathic helix の親水性面の構成に大きく寄与していると考えられるが、それらの個々を構造的に保守的なグルタミン残基に置換しても COS 細胞を用いた測定系ではウイルス粒子へのエンベロープ蛋白質の取り込み低下という表現型の変化は認められなかった。したがって少なくとも個々のアルギニン残基のうちでどれか一個だけの変異で表現型の変化に至るほどの貢献はしていないようである。この点はさらに変異体の組み合わせ、異なった荷電を持つアミノ酸残基への置換などによって検証される必要がある。segmentII の途中でのストップコドンやフレームシフト変異の導入はエンベロープ蛋白質の細胞内動態に影響を与え、その結果としてウイルス粒子上へのエンベロープ取り込みの低下をもたらす結果を得た。これが segmentII 自身の変異のみに起因するのか失われた segmentI の寄与が大きいのかは不明である。いずれにしても今回作成した rev を nef 領域に移行したプロウイルスクローンは g p 4 1 部分のより詳細な変異体作成および解析を可能にする点で将来的に有用であると考えられる。

E 結論

rev を nef 領域に移行させたプロウイルスクローンを作成することにより g p 4 1 細胞質内部分の変異体作成を rev への影響を与えることなく行えるようになった。gp41 細胞質内部分に存在するふたつの amphipathic helix のうちの segmentII 途中でのストップコドンやフレームシフト変異の導入はエンベロープ蛋白質の細胞内動態に影響を与え細胞表面への発現を低下させる。その結果ウイルス粒子上へのエンベロープ蛋白質の取り込みが低下する。今後 segmentII あるいは segmentI と相互作用する細胞側蛋白質の検索等を含めた解析が必要である。

F,G 研究発表, 知的所有権の取得状況
該当無し

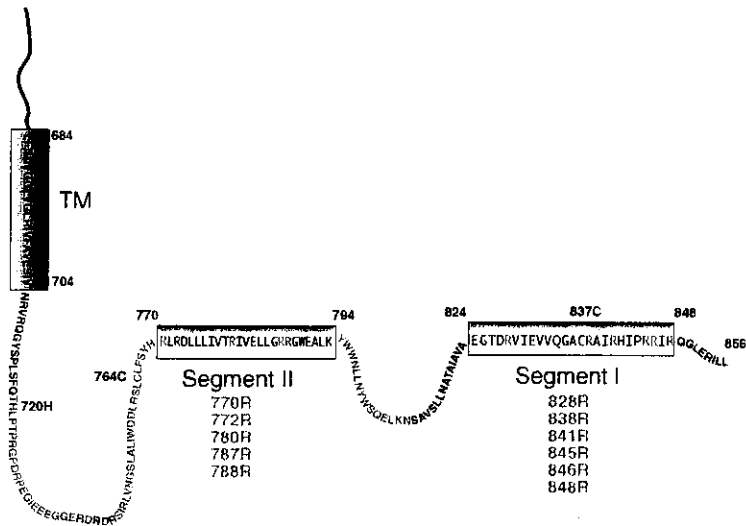


Fig.1 Schematic diagram of intracellular domain of gp41. Predicted alpha-helices are shown in rectangle. Green letter indicates the portion overlapping with rev coding region. Arginine residues are shown in red. Mutated arginine residues in segment I and II are shown.

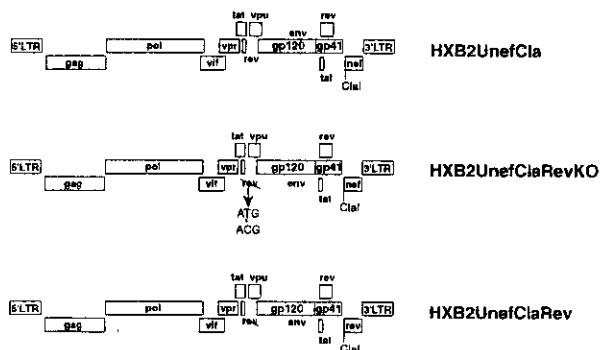


Fig.2 Clones used in this study. All clones are the derivatives of a molecular clone HXB2. HXB2UnefClaRev has rev cDNA in the place of nef. The original rev was destroyed by site-directed mutagenesis. As Rev is supplied in the nef region, any mutations in the gp41 region which is overlapping with rev does not have any adverse effect on Rev. All the mutants were created in HXB2UnefClaRev context.

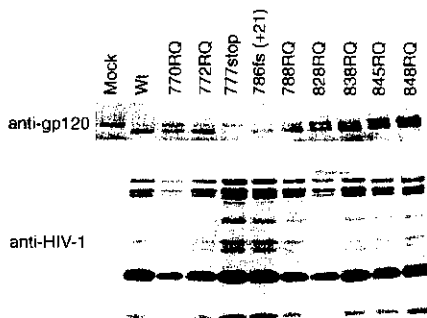


Fig.3 A representative protein profile of several of RQ mutants. The virus carrying a specific mutation in the cytoplasmic domain of gp41 was prepared from COS cells and analysed by immunoblotting. All RQ mutants but 777stop and 786fs showed no significant effect on Env incorporation onto virions.

Nefの機能解析と治療法の開発

分担研究者	松田道行	国立国際医療センター研究所臨床病理研究部
共同研究者	飛梅 実	国立国際医療センター研究所臨床病理研究部
	巽 正志	国立感染症研究所獣医科学部
	山田武司	東京大学医科学研究所
	岩本愛吉	東京大学医科学研究所

研究要旨 昨年度までにNefのウイルス感染増強能を感度良く検出する系を作成した。最終年度は、これを利用して、これまで議論の分かれていたHIV感染長期未発症者から分離したHIVのNefの機能を調べた。その結果、高感度感受性細胞株を使うことにより、長期未発症者のウイルスにおいてはNefの機能が弱いながらも低下していることを見出した。この結果は、Nef欠損HIVのワクチンとしての可能性を支持するものであると同時に、Nefに対する薬剤がエイズの発症予防効果があるであろうことを予測するものである。

A. 研究目的

HIV-1感染後長期未発症者 (LTNP) は、HIV-1感染者の約5%を占め、薬剤の投与を受けずに10年以上、症状の認められない感染者を指す。これらLTNPにおいてNefの欠損を有しているウイルスのみが検出されることがあり、Nefがエイズ発症の規定因子ではないかという意見がある。一方、大部分のLTNPから分離されるHIV-1のNefは少なくともアミノ酸配列上、他のHIV-1と明らかに区別することはできず、Nefが病原性を規定しているわけではないという意見もある。そこで、昨年度までに開発したNefの機能を高感度に検出する系を用いて、HIV-1感染後長期未発症者において増殖しているHIV-1のNefの機能を解析し、Nefが病原性を規定している可能性を探る。

B. 研究方法

Nefの機能測定のためのウイルス作成： HIV-1 NL4-3株の感染性分子クローンpNL432は、徳島大学足立昭夫教授より供与いただいた。このNefの部位にPCRを用いた方法で制限酵素切断部位発現ベクターSalIおよびNotIをNefの開始コドンの部位に挿入しpNL-Notと命名した。

Nef遺伝子のクローニング： AIDS患者、HIV-1感染後長期未発症患者、およびAC期のHIV-1感染患者のPBMCより得たNef遺伝子を研究班員の岩本から供与を受けた（これらは既に発表済みのものである）。これらのDNAおよびpNL432を鋳型としてPCRでDNAを増幅し、pNL-Notおよび哺乳細胞発現ベクターpCAGGSに挿入した。

感染性ウイルスの作成： pNL432由来の感染性DNAを293T細胞にリン酸カルシウム法を用いて導

入した。48時間後に、上清を回収し0.45 μm のフィルターに通した後、ウイルス量を、p24gagに対するELISA法にて定量した。

MAGNEF細胞の樹立： HeLa-CD4-LTR- β GAL

(MAGI)細胞由来のMAGIC5細胞は国立感染症研究所の巽博士に供与いただいた。この細胞株を96ウェル細胞培養皿に、1ウェルあたり、約0.2個になるように限界希釈し、3日に一度培地交換しながら2週間継代し、複数のクローンを樹立した。これらをトリプシン-EDTAで24ウェルプレートに巻きなおし、さらに増やした。次に、 5×10^5 個の細胞を、1%ウシ胎児血清と過剰量の抗CD4抗体を含むリン酸緩衝液と4度で30分反応させ、リン酸緩衝液で5回洗浄した。その後、FITC結合抗マウスヒツジIgG (DAKO社)と反応させた後に、FACSCalibur (ベクトンディッキンソン)にて、CD4の発現量を解析した。CD4の発現量の低いものを選んで、以下に示す方法で野生型NL4-3ウイルスとそのNef欠損型ウイルスを感染させ、最もNef要求性の強い細胞株をMAGNEF細胞と命名し、実験に供した。

MAGIアッセイ： 293T細胞にトランスフェクトし得られたウイルス液を、階段希釈した後に、96ウェル細胞培養皿上に付着させた40000個のMAGNEF細胞に感染させる。48時間後にホルマリン固定した後、X-galで染色して感染細胞数を測定した。感染細胞を計測する際には、陽性細胞数がおおよそ50個程度のウェルを選んで数え、ウイルスの感染価を決めた。この範囲がもっともウイルス希釈と感染細胞数に直線性が保たれることをあらかじめ確認してある。

発現蛋白の確認： ウイルス作成に用いた293T細胞を、Triton X-100を1%含む緩衝液にて可溶化し、遠心後、その上清をSDS-PAGEにて分離し、抗Nef

抗体、抗Gag抗体等を用いたイムノブロッティングにて検出した。

患者由来のNefを発現させた細胞におけるCD4およびMHCクラスIの量：MAGI細胞にpCAGGSにNefを挿入したベクターをトランスフェクトする。24時間後に、表面に発現しているCD4およびMHCクラスIの量をFACS解析した。

C. 研究結果

① MAGNEF細胞の樹立：昨年度までの研究で、レポーター細胞のCD4量を減らすことでHIV-1感染におけるNef要求性を増加させることができる事を明らかにしたので、本年度は、CD4発現量の低い細胞株の樹立を行った。複数の細胞株のうちFACS解析によりCD4の量が低く、20代以上継代してもCD4の量が安定している細胞株を樹立し、MEGNEF細胞と命名した。

② 患者由来のNefを発現するベクター：患者由来のNefをPCRで増幅し、それを組み込んだウイルスを作成した。これらのDNAの核酸配列を系統樹を作成した解析したが、AIDS期、AC期、あるいはLTNPの患者、いずれの群もまとまった集団を作らず、単純な核酸配列においてはLTNP期に特殊のものはないことがわかった。また、PxxPモチーフやRRモチーフなど、機能ドメインとされる領域はいずれにおいてもよく保存されており、アミノ酸配列上においてもLTNPを特徴付けるものは見出せなかった。

③ 患者由来のNefを発現するウイルス：つぎに、これらのプラスミドを293T細胞に導入しウイルスを作成した。これらのウイルスはいずれも、予想される大きさのNefを発現していることがイムノブロッティングで確認された。

④ 患者由来のNefを発現するウイルスの感染性：次に、これらのウイルスの感染性をMAGNEF細胞を用いて解析した。その結果、LTNP由来のNefを有するHIV-1は、それ以外のNefを有する群と比較すると明らかに感染性が低下していた。ところが、この同じウイルスを親株のMAGIC 5細胞や末梢リンパ球を用いて解析しても、Nefの有無による感染性の差は認められなかった。

⑤ 患者由来のNefを発現させた細胞におけるCD4およびMHCクラスIの量：LTNP、AIDS期、あるいはAC期の患者ゆらいのいずれのNefもCD4およびMHCクラスIを低下する能力を有するものとしめないものが混在しており、病期による違いは認められなかった。

D. 考察

本研究においては、まず、HIVの病原性遺伝子Nefのウイルス感染増強作用を高感度にアッセーする細胞系を樹立し、これを用いてLTNP患者のNefの機能を評価した。その結果、例えばアミノ酸配列上に明らかな機能低下を示唆する変異がなくても、LTNPの患者のNefは、AIDS期およびAC期の患者と比較して機能が低下していることを見出した。LTNPは、薬剤投与を受けていないのでそのコントロールとして薬剤投与を受けていないAC期の患者を用いたのであるが、それでも差が認められたという事実は、やはり、LTNPになる患者には最初からNefの機能が低下したHIV-1は主として広がったと考えるべきであろう。この結果は、Nef欠損HIV-1を生ワクチンとしようとする現在の動きを支持するものである。

一方、今回の研究結果は、AC期の患者のNefを用いて、将来の予後を予想しうることも示している。MAGNEF細胞は、それを可能にするものとして非常に有用である。ただし、NefをNL4-3ベースのベクターにいれ、これを用いて感染実験を行うというシステムは、実際の診療には実用的ではない。Nefをトランスに補うシステムなどの開発が今後の課題である。

また、今回の核酸配列およびアミノ酸配列の解析結果からはLTNPのHIV-1とその他のHIV-1とを分離することはできなかったが、今後、症例数を増やすことで、何らかのLTNPのコンセンサス配列を見出すことが可能かもしれない。

さらに、今回の研究で、CD4やMHCクラスIの表面からの取り込みには一定の結果が得られないということもわかった。このことは、おそらくこれらのNefの機能が、HIV-1によるエイズ発症にはあまり重要な役割を果たしていないということを示しているものと思われる。

E. 結論

エイズ感染後長期未発症者においてはNefの機能が低下していることを示した。

F. 研究発表

[論文発表]

M. Tobiume, K. Tokunaga, E. Kiyokawa, M. Takahoko, N. Mochizuki, M. Tatsumi, and M. Matsuda. Requirement of Nef for HIV-1 infectivity is biased by the expression levels of Env in the virus-producing cells and CD4 in the target cells. Arch.Virol. 2001.(in press)

[学会発表]

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
学術集会 津 平成12年10月

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

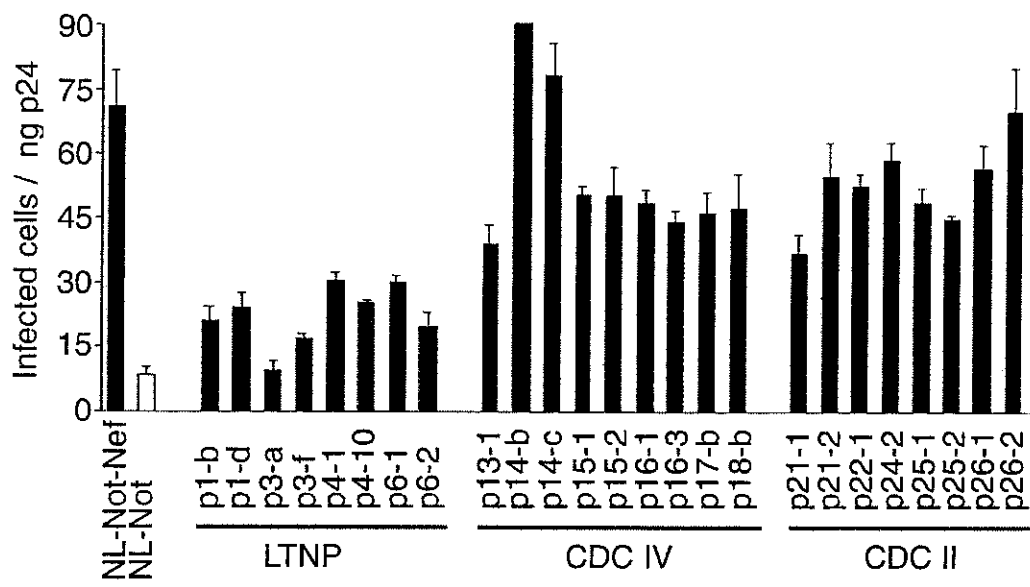


図 エイズ感染後長期未発症者においてはNefの機能が低下している。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
山田章雄	ムンプスのヒトにおける病理と動物モデル	臨床とウイルス	26	13-15	1998
棚林 清、 向井鎌三郎、 山田章雄	B ウイルス病とは何か	検査と技術	27	1551-1552	1999
Uda A., Tanabayashi K., Mukai, R., Yachi, M., Nam, K.H., and Yamada, A.	CD3 polymorphism in cynomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>).	J. Med. Primatol	in press		2001
Takano, J., Narita, T., Fujimoto, K., Mukai, R., and Yamada, A.	Detection of B virus infection by the enzyme-linked immunoassay using simian agent 8 as antigen.	Exp. Anim.	in press		2001
Tanabayashi, K., Mukai, R., and Yamada, A.	Detection of B virus antibody in monkey sera using glycoprotein D expressed in mammalian cells.		in press		2001
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. Immunol.	44	111-121	2000
Tahara-Hanaoka S, Ushijima Y, Tarui H, Wada M, Hara T, Imanishi S, Yamaguchi 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

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.	in press		2001
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	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- α or IL-1 β 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- κ 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- κ 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- κ B.	Oncogene	19	2233-2239	2000
Kanazawa, S., Okamoto, T., Matija Peterlin, B.	Tat competes with C \uparrow 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- κ 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 \uparrow TA.	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- κ B p65-Mediated Transactivation.	J.B.C	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	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: J.	Polymorphism in the interleukin-4 promoter affects acquisition of human immunodeficiency virus type 1 syncytium-inducing phenotype.	Virol.	74	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 1a	J. Virol	74	1787-1793	2000