

2000/034 ~ 1050

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究

研究報告書

目 次

課題番号

第1分野 抗エイズウイルス薬、エイズ不随症状に対する治療薬の開発に関する研究

10101	国内未承認エイズ治療薬等を用いたHIV感染症治療薬及びHIV感染症至適治療法の開発に係る応用研究	福武 勝幸	……	1
10102	エイズ医薬品候補物質のスクリーニング研究	棚元 憲一	……	13
10103	HIV第二受容体拮抗剤を基盤分子とする戦略的抗エイズ剤の創製と実用化	藤井 信孝	……	16
10104	HIVインテグラーゼおよび複製を制御する蛋白質を標的とする抗ウイルス剤の開発	藤原 民雄	……	22
10105	アポトーシス抑制作用を有する新規抗エイズ薬の開発	吉野公一郎	……	28
10106	細胞性因子を標的にした抗HIV薬の開発研究	金岡 昌治	……	35
10107	カリニ肺炎のゲノム創薬研究	西村 暹	……	46
10108	逆転写酵素阻害剤の併用療法に関する研究	湯浅 聡	……	51
10109	難薬剤耐性且つ多機能を指向した抗エイズ薬の開発及び抗CCR5-CXCR4キメラ環状テトラデカペプチド抗体による感染防御	加藤 英夫	……	61
10110	遺伝子発現制御機能を持つ亜鉛サイクレン錯体による抗エイズ薬の研究	山本 直彦	……	72
10111	HIV-1の細胞侵入機構の解析による抗エイズウイルス薬の開発	鈴木 達夫	……	77
10113	新規クロニング翻訳調節蛋白やIL-15、IL-16、CD26阻害剤によるエイズおよびエイズ付随症状の治療・診断研究	岩倉洋一郎	……	88

第2分野 エイズワクチン等エイズ発症防止薬の開発に関する研究

10201	HIV日本人株及び東南アジア株に対するワクチンの開発とAIDS予防法に関する研究	小室 勝利	……	99
10202	HIV-1vpr遺伝子を用いたHIV感染細胞のアポトーシスによる排除技術の開発	森田 裕	……	115
10204	HIVによる免疫機能不全を治療・予防する新規ワクチンの開発	金子有太郎	……	121

第3分野 抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発等に関する研究

10301	エイズ治療薬開発のための評価スクリーニング系の開発	永井 美之	……	133
10303	HIVの病原性遺伝子Nefを標的とした抗AIDS薬開発のための基盤研究	松田 道行	……	144

第2分野

エイズワクチン等エイズ発症防止薬 の開発に関する研究

HIV-1vpr遺伝子を用いたHIV感染細胞のアポトーシスによる排除技術の開発

所 属 チッソ株式会社 バイオセンサー部長
主任研究者 森田 裕

<要 旨>

HIV 感染細胞を破壊するための道具として、HIV-1 アクセサリー遺伝子の一つである *vpr* の欠失変異体を選択した。しかし、*vpr* 遺伝子産物はアポトーシス以外にも様々な機能を発揮する。そこで、Vpr の細胞に及ぼす効果を知るため、HIV-1 感染性 DNA クローン pNL432 由来の *vpr* 遺伝子断片の欠失および点変異体を HeLa 細胞に導入した。その結果、Vpr の C 末端に存在する arginine rich region を欠失した C81 は、G2 期 arrest ではなく G1 期 arrest によるアポトーシスを介して細胞の増殖を抑制すること、このアポトーシス誘導には、N 末端から 81 番目までの領域が必要であった。また、野性型 Vpr にも、C81 より弱いアポトーシス活性が検出された。この野性型 Vpr によって誘導されるアポトーシスは C81 変異体によるアポトーシスと同じ pathway で、即ち、G2 期 arrest とは異なる機序で誘導されることを世界に先駆けて明らかにした。

次に、C81 をコードする遺伝子断片を発現ベクター pHIV-LTRbsr に挿入し、HIV-1 Tat 蛋白により発現誘導可能な系を確立した。更に、*in vivo* の遺伝子治療に応用するため、ベクターを封入するリポソームを検討した。その結果、陽性荷電リポソーム (TMAG) が有効であること、更に、モノクローナル抗体結合リポソームは抗体非結合リポソームに比べ、*in vitro*、*in vivo* において標的細胞に対し高い遺伝子導入効率を有する事が明らかにした。

Vpr のアポトーシスの誘導機構を明らかにするため、Vpr の3次元構造の解析と結合する細胞内因子同定を試みた。まず、細胞増殖抑制活性を保持した Vpr を大量に産生する酵母株を得ることに成功した。さらに、Vpr は HHR23A および UBA domain および塩基性 NLS のレセプターである Imp α 及び β と相互作用することを明らかにした。

1. 研究組織

- (1) チッソ株式会社 新事業開発室 森田 裕 バイオセンサー部長
- (2) 理化学研究所 分子細胞生物学研究室 間 陽子 前任研究員、蒲田政和 基礎科学特別研究員
- (3) 神奈川科学技術アカデミー 緒方「タンパク機能制御 プロジェクト」 緒方一博 研究室長
- (4) 東京大学 医科学研究所 渡邊俊樹 助教授
- (5) 大阪府立大学 農学部 渡来 仁 助教授

2. 研究目的

3剤併用療法によっても除去できない潜伏 HIV を排除する事が強く望まれる。そこで、著しいアポトーシス活性を有する *vpr* 遺伝子 C 末端欠失変異体を用いて、HIV 感染細胞を直接的に破壊するための技術開発を本事業の目的とする。targeting の特異性を高めるため、*vpr* を HIV-1 LTR の下流に連結後、更に抗-HIVgp120 抗体結合リポソームに封入する。本技術は感染細胞を“アポトーシス”で排除することにより、最終的にウイルスを排除しようとするものである。従って、無症候キャリアーの HIV 感染細胞を選択的にかつ効率良く排除することによって、無症候キャリアーの早期治療を可能にできると期待される。

Vpr はアポトーシス以外にもウイルスの転写活性化能或いは G2 期 arrest 能を有する多機能な蛋白質であり、アポトーシス以外の機能を失活した変異体の作出が必須である。そのため、Vpr の多様な機能の発現機序を解明することが望まれる。本年度は、Vpr の3次元構造の解析のための組み換え型 Vpr の大量精製、アポトーシス誘導能の最小機能ドメインの同定、更にアポトーシス以外の機能解析を行った。また、アポトーシスの最小機能 domain を組み込んだ発現ベクターの構築と封入リポソームの選別を行った。

3. 研究方法

- 1) Vpr と変異体の機能解析 --- HIV-1 感染性 DNA クローン pNL432 の *vpr* 遺伝子の欠失及び点変異体を作製し、発現ベクターに挿入後、electroporation 法にて各種細胞に導入した。抗 Flag 抗体及び Cy3 標識抗マウス IgG 抗体で免疫蛍光染色後に、細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。細胞増殖に及ぼす効果を、 $[^3\text{H}]$ thymidine の細胞内への取り込み量の測定と colony 形成法により、細胞周期を Flow cytometry 法により解析した。またアポトーシス細胞の検出を、Annexin V を用いた蛍光染色及び Caspase-3 活性を測定することにより行った。
- 2) yeast two-hybrid 法による Vpr 結合因子の検索 --- 野生型 Vpr とその6種類の変異体を bait として用いた。yeast two-hybrid 法により、human CD4⁺ T-cell 或いは HeLa cDNA library をスクリーニングした。得られた陽性クローンについて、酵母での共導入実験を行なった。
- 3) pull-down 法による Vpr 結合因子の検索 --- Vpr と Imp α 1、 α 2 及び β 1 との結合の有無を検討した。N 末端側に GST を持つ組み換え型ヒト Imp α 1、マウス Imp α 2、及びマウス Imp β 1 を *E. coli* BL21 (DE3) 株で発現させ、glutathione (GSH)-Sepharose beads にて回収した。野性型及び各種変異型 Vpr、あるいは Vpr の2つの α -helix

domain を各々連結したキメラ GFP (H1-GFP および H2-GFP) を *in vitro translation* あるいは酵母発現系を用いて調製した

- 4) Vpr の大量精製 --- *vpr* 遺伝子断片に Flag 配列を連結後、大腸菌発現用ベクター pET-16b、pET-23d(+) 及び pET-29a(+), 或いは酵母発現用ベクター pPICZα に挿入した。Vpr 蛋白発現のため、大腸菌発現用ベクターを Nova Blue (DE3) 株に、*Sac I* によって直鎖状にした酵母発現用ベクターを KM71 (Mut^r) 株に導入した。Vpr の発現誘導を大腸菌では 1 mM IPTG で、酵母では 3%メタノールで行った。得られた組換え型 Vpr を各種細胞株に添加後、細胞増殖に及ぼす効果を [³H]thymidine の取り込みで解析した。
- 4) *vpr* 遺伝子断片を発現ベクター pHIV-LTRbsr に連結後、様々な細胞株に Tat 発現ベクターと共導入し、アポトーシス誘導活性を調べた。
- 5) 種々の陽性荷電リポソームを作製し遺伝子導入効率を比較した。また、モノクローナル抗体を結合させた遺伝子封入陽性荷電リポソームの、*in vitro* 及び *in vivo* における細胞への遺伝子導入効率を調べるため、モデル細胞として牛白血病細胞株 (KU-17) を、ベクターとしてジフテリア毒素遺伝子発現ベクター (pLTR-DT) を用いた。targeting のため、pLTR-DT 封入 TMAG リポソームには牛白血病細胞を認識するモノクローナル抗体を SPDP により結合させた。*In vitro*, *in vivo* における遺伝子導入効率は、KU-17 細胞の増殖抑制率により算出した。

4. 研究成果

1) Vpr 蛋白によるアポトーシス誘導機序の解析とその最小機能ドメインの同定

Vpr の増殖抑制効果の機序を解析するため、Vpr の 2 つの α -helix domain、leucine zipper 様 domain、arginine rich region の欠失変異体を組み込んだ 10 種類の発現ベクターを構築し、HeLa 細胞に導入後、Flow cytometry 法による細胞周期解析及び colony 形成法による細胞増殖能を調べた。

Vpr の C 末端に存在する arginine rich region を 81 番目まで欠失した C81 変異体は、HeLa 細胞に G2 期 arrest を全く誘導しなかったが、著しい細胞増殖抑制活性を示した。一方、C81 以外の変異体は全て、G2 期 arrest 及び細胞増殖抑制活性を共に消失していた。次に、Vpr の C 末端側に存在する leucine zipper 様 domain 中の 60、67、74、81 位の Leu/Ile 残基を Pro に置換した点変異体を作製した。まず、野生型 Vpr の点変異体 (I60P、L67P、I74P、I81P、L67/I74P、I60/I81P) を HeLa 細胞に導入し、FACS 解析を行った。I74P、I81P 変異体では G2 期 arrest 能は完全に消失したが、I60P、L67P では G2 期 arrest 能は部分的に残っていた。またコロニー形成法でも増殖抑制活性を調べたが、G2 期 arrest 能を完全に消失した I74P、I81P では増殖抑制は認められなかった。更に、C81 の点変異体 (I60P/C81、L67P/C81、I74P/C81、I81P/C81) を HeLa 細胞へ導入したところ、 [³H]thymidine の取り込みは 60、67、74 位に点変異を導入した場合に、対照レベルまで回復した。一方、81 位の変異体では、C81 の約 40% の増殖抑制活性を残していた。以上の結果から、G2 期 arrest の発揮には 74、81 位の Ile 残基が、C81 によって誘導される細胞増殖抑制には 60、67、74 位の Ile/Leu 残基が重要であることが示された。このことは、これら 2 つの細胞増殖抑制は leucine zipper 様 domain の異なるアミノ酸残基に依存して発揮されること、則ち、これらの細胞増殖抑制活性は異なる経路を介して発揮される可能性が示された。

続いて C81 によって誘導される増殖抑制の機序を解析した。まず、細胞増殖マーカーである BrdU の細胞内への取り込みを抗-BrdU 抗体を用いた蛍光染色により検討した。Vpr と C81 発現細胞では抗-BrdU 抗体で染色される細胞が対照ベクター導入細胞と比較して減少していたことから、増殖抑制が起こっていることが確認された。次に DNA 複製のライセンス化に関わる因子である MCM 蛋白の核内局在を抗 MCM 抗体を用いた蛍光染色で調べた。MCM は細胞周期の S

期後期～G2 期にかけて DNA から遊離するため、界面活性剤によって容易に核から溶出される。従って、界面活性剤処理した S 期後期～G2 期の細胞は、抗-MCM 抗体によって核が染色されない。この性質を利用して解析した結果、

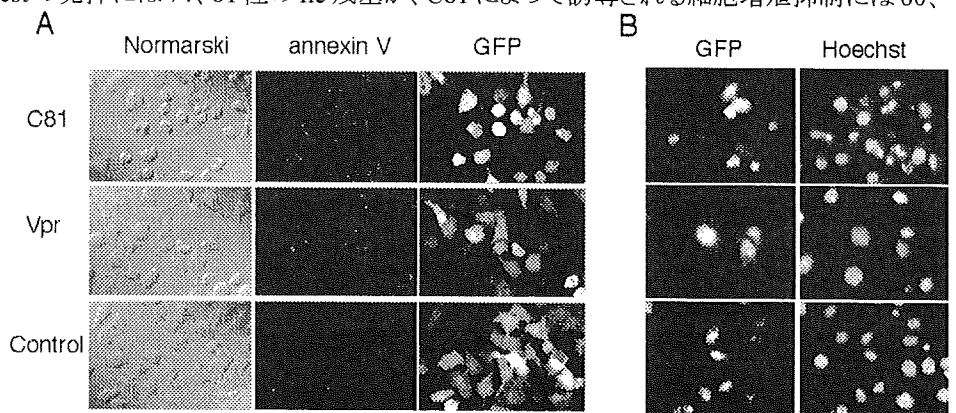


Fig. 1. The expression of C81 induced apoptosis in HeLa cells. HeLa cells were transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged wild-type Vpr or Flag-tagged C81 or with the control pME18Neo-Flag together with the GFP expression vector pEGFP-N1 (A and B) or without this vector (C). GFP was used as the reporter molecule for discrimination between transfected and untransfected cells. (A) Thirty-six hours after transfection, cells were stained with annexin V-biotin and streptavidin-PE for identification of apoptotic cells. (B) HeLa cells were fixed in 1% of formaldehyde and then in 70% ethanol and stained with Hoechst 33258 to monitor the morphology. Apoptotic bodies were revealed by fluorescence microscopy. (C) HeLa cells were harvested 36 h after transfection and then caspase-3 activity was measured with a colorimetric kit.

Vpr 発現細胞では核が染色されない G2 期の細胞が多く見られるのに対し、C81 発現細胞では核が染色されている細胞、即ち G2 期ではない細胞が対照ベクター導入細胞とほぼ同程度観察された。この結果から、C81 による増殖抑制は G2 期 arrest とは異なることが再確認された。C81 導入細胞の細胞周期を FACS によって解析したところ、C81 導入細胞の G2/M:G1 比は対照の 0.32 に比較して極端に低下し 0.04 となった。即ち C81 の増殖抑制効果が G2 期 arrest ではなく、むしろ G1 期 arrest である可能性が示唆された。C81 による増殖抑制が、アポトーシスか否かを同定するため、Annexin V を用いた蛍光染色を行った。その結果、C81 発現細胞では Annexin V によって染色される細胞が対照や Vpr 発現細胞に比べて顕著に増加していた (Fig. 1)。また Hoechst 33258 を用いた核染色において、C81 発現細胞ではアポトーシス細胞の特徴である核の凝集像が高頻度に観察された (Fig. 1)。更に、C81 導入細胞では、アポトーシスの実行因子として知られる Caspase-3 活性の顕著な上昇が見られた (Fig. 1)。これらの結果から、C81 はアポトーシスによって細胞増殖抑制を誘導することが明らかになった。さらに、HeLa 細胞に C81 発現ベクターを導入し、C81 によって誘導される G1 期 arrest とアポトーシスの経時的变化を、Caspase-3 活性、annexin-V 陽性細胞数、及び G1 期 arrest 誘導を指標に調べた。G1 期 arrest とアポトーシスは同時に誘導され、導入後 36 時間で最大活性を示した。次に、G1 期 arrest とアポトーシスに leucine zipper 様 domain の 60、67、74 と 81 位の Ile/Leu 残基のどこが関与するかを決定した。いずれの活性の発揮にも、60、67、74 位の Ile/Leu が重要であった。これらの結果から、C81 変異体によって誘導されるアポトーシスと G1 期 arrest は同じ pathway によって誘導される可能性が示唆された。また、アポトーシス活性は、Vpr の C 末端から 74 番目までの領域を欠失した C74 変異体及び N 末端を欠失した変異体では完全に消失した。以上の結果から、アポトーシス誘導には、Vpr の N 末端から 81 番目までの領域が必要であることが明らかとなった。

また、野生型 Vpr にも、C81 より弱いアポトーシス活性が検出された (Fig.2)。この野生型 Vpr によって誘導されるアポトーシスは、C81 と同様に leucine zipper 様 domain 中の 60、67、74 位の Ile/Leu 残基が重要であった。従って、野生型 Vpr によるアポトーシスは、C81 変異体によるアポトーシスと同じ pathway で誘導される可能性が示された。一方、野生型 Vpr の 67、74 位の Leu/Ile を Ala に置換した L67A、I74A 及び L67/I74A 変異体は、アポトーシス活性を持たないが G2 期 arrest 能を有することが明らかとなった。このことから、野生型 Vpr が誘導するアポトーシスは、G2 期 arrest とは異なる機序で誘導されることが明らかとなった。

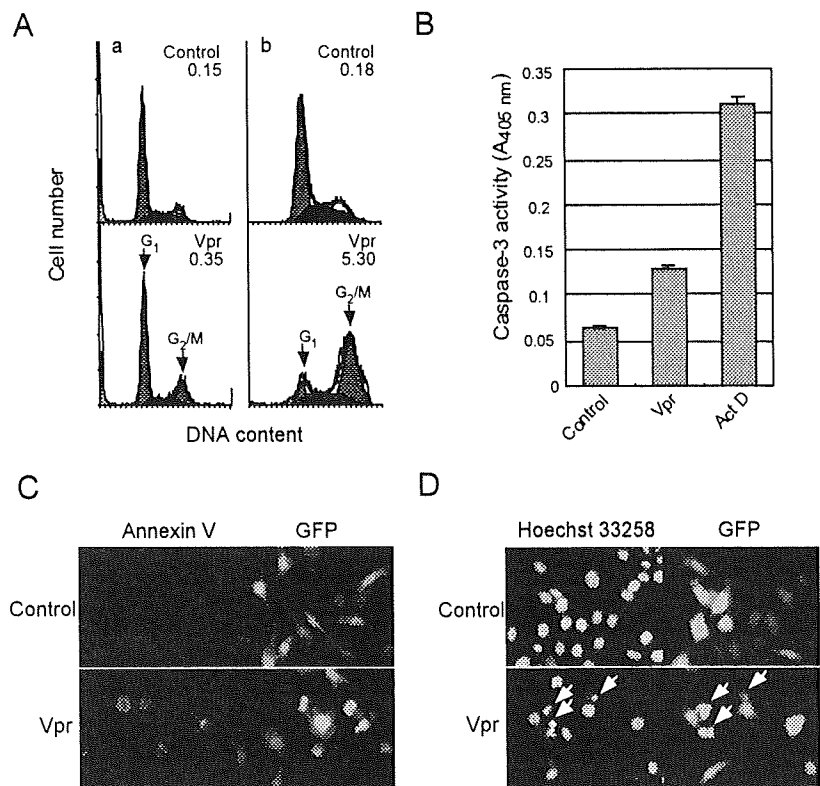


Fig. 2 Analysis of apoptosis in HeLa cells that expressed wild-type Vpr. HeLa cells transfected with pME18Neo that encoded Flag-tagged Vpr or control pME18Neo-Flag together with the GFP expression vector pEGFP-N1 (A, C and D) or without it (B). GFP was used as a reporter molecule for discrimination between transfected and untransfected cells. (A) Twenty-four hours (a) or 72 h (b) after transfection, cells were harvested for analysis of DNA content. They were stained with PI and cells that were GFP-positive were analyzed by flow cytometry as described in the text. Arrows indicate peaks of cells at the G1 and G2/M phases. The G2/M:G1 ratio is indicated in the upper right of each graph. (B) Twenty-four hours after transfection, cells were harvested and lysed and caspase-3 activity was measured as described in the text. Actinomycin D (ActD) which is a potent inducer of apoptosis was used as a positive control. (C) Twenty-four hours after transfection, cells were stained with annexin V-biotin followed by streptavidin-PE for identification of apoptotic cells. Cells that were GFP-positive were identified for comparison. (D) Twenty-four hours after transfection, cells were fixed and stained with Hoechst 33258 for visualization of apoptotic morphology. Apoptotic bodies (arrowheads) were identified by microscopic analysis.

2) yeast two-hybrid 法による Vpr 結合因子の検索

Vpr によるアポトーシス誘導の解明を最終目標に、Vpr と結合する細胞内因子を同定を試みた。野生型 Vpr と同様の発現能、核膜・核への局在能を保持しているが細胞増殖抑制能を完全に消失している、Vpr17-81 変異体を bait として、yeast two-hybrid 法により、ヒト CD4⁺T-cell あるいは HeLa cDNA library をスクリーニングした。UNG、HHR23A を含む 5 種類の既知の蛋白質と、6 種類の未知の蛋白質をコードする遺伝子が同定された。この中で、ヌクレオチド除去修復機構関連分子の一つ HHR23A に注目した。まず、Vpr との結合に UBA domain だけが必要であるのか、全長でも結合するのかを yeast two-hybrid 法により解析した結果、C 末端側 UBA domain とで特に強い結合が認められた。そこで、UBA domain との結合に必要な Vpr 側の領域を調べた。UBA domain との結合に特に重要である部位は、 α -helix 1 domain の 33 位、leucine zipper 様 domain の中央の 67 および 74 位であることを明らかにした。この Vpr と UBA domain との結合に必須な残基と核局在および G2 期 arrest の機能発現に重要な残基を比較するために、上述の変異体を

HeLa細胞に導入し、核局在能を蛍光免疫染色により、細胞周期をフローサイトメトリー法を用いて解析した。その結果、UBAドメインとの結合能を消失した変異体でも、核局在またはG2期 arrestは完全には消失しなかった。以上の結果は、これらの機能には、UBA domainとの結合は直接関与しないか、あるいは、UBA domainを有する分子が、単独ではなく、他の因子と共同で相互作用することによって、これらの機能に関与しているという可能性も考えられた。次に、UBA domainとの結合が、哺乳類細胞におけるVprの機能発現に影響するかどうかを調べため、HeLa細胞への共導入実験を行った。VprにFlag-tagを、HHR23Aの全長およびUBA domainにHA-tagを付加した発現ベクターをHeLa細胞に共導入し、まず蛍光免疫染色で両分子の発現を確認した。次に、VprのG2期 arrest能に対する、HHR23A全長およびUBA domainの影響を、フローサイトメトリー法により調べた。HHR23Aの全長、またはUBAドメインを、Vprと同量、5倍、および10倍量まで共導入した結果、いずれもG2期 arrestに殆ど影響が見られなかった。以上のことから、HHR23AおよびUBA domainはVprによるG2期 arrestに直接は関与しないという可能性が示唆された。全長のHHR23Aはyeast two-hybrid法においてVprとの結合が殆ど見られなかったことから、この分子そのものよりも、むしろ、UBA domainを有する他の分子が、さらに他の分子と共に相互作用して、VprによるG2期 arrestに関与する、あるいはG2期 arrest以外の他の機能発現に関与している可能性が示唆された。

3) pull-down 法による Vpr 結合因子の検索

Vprには、核局在化シグナル(NLS)として機能する2つの α -helix domain(H1 domain:17-34位、H2 domain:46-74位)が存在し、これらは共にVprの核局在化に重要である。Vprと相互作用する細胞内因子として、これまでに塩基性NLSのレセプターであるImportin(Imp) α ($\alpha 1$ 及び $\alpha 2$)、核膜孔蛋白Nsp1p及びPom121などが報告されている。しかしながら、Vprの核局在化を担う細胞内因子、並びに核局在化の分子機序は未だ不明である。我々はImp α 及びその核輸送担体であるImp β に着目し、これらの分子とVprとの相互作用の有無を検討した。

In vitro translation 或いは酵母発現系で作製した野性型Vprは、pull-down法において、大腸菌で発現後glutathione-Sepharose beadsで精製したGST融合型Imp α 及び β と結合した。次に、Imp α 或いは β との結合に必要なVpr側のドメインの同定を試みた。核局在能が減弱或いは消失する変異型Vpr蛋白を*in vitro translation*で調製し、同様の解析を行った。H2 domainに変異を持つL67P変異体はImp α 及び β に対する結合力が共に減弱した。一方、H1 domainに変異を持つ α LA変異体はImp α 及び β に対し、野性型と同程度結合した。*In vitro translation*により作製したH2 domainのみを連結したGFP融合蛋白はImp α 及び β に結合したが、H1 domainを連結したものでは何れとも結合出来ないことが明らかになった。以上の結果より、VprはH2 domainを介してImp α 及び β と相互作用している可能性が示唆された。現在、他の因子の存在下での相互作用を検討すると共に、Imp α/β との相互作用とVprの機能との関係を解析中である。

4) 高次構造解析のための、酵母発現系を用いた組換え型 Vpr 蛋白の作製

Vprの3次元構造を核磁気共鳴或いはX線結晶構造解析法により解析するために、酵母発現系を用いて組み換え型Vprの大量精製に成功した。Flag-vpr遺伝子を発現ベクターpPICZ α に挿入し、*Pichia* KM71株に導入した。このベクターの特徴は分泌型の発現系であることで、Flag-vpr遺伝子のN末端側に連結された分泌シグナル配列(α -factor)によってVprは培養上清中に分泌される。この酵母発現系では、3%メタノールによる発現誘導の結果、増殖抑制は見られず、誘導から4日目に培養上清中に十分量の組換え型Vprを産生することができた。このVprは陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた場合に良好に精製された。更に、組換え型Vprの活性を評価するために、各種細胞株に組換え型Vprを添加し48時間培養後 ^3H thymidine取り込み量を測定した。原液或いは2倍希釈したサンプルを添加した場合、対照の培養液を添加した場合と比較して、 ^3H thymidineの取り込み量が大幅に減少した。この時、抗-Flag抗体及びCy3標識抗-マウスIgG抗体で免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察したところ、細胞内のVprが特異的に染色された。即ち、組換え型Vprは細胞膜を通過し細胞内部に取り込まれていること、さらに、細胞増殖抑制活性を保持していることが明らかになった。現在、精製Vprの3次元構造を核磁気共鳴或いはX線結晶構造解析法により解析するための準備を進めている。

最終的に、細胞内因子と結合した状態でのVprの3次元構造を明らかにするため、yeast two-hybrid法によってVpr結合蛋白の一つとして同定されたHHR23AとVprとの結合ドメインを決定した。

5) アポトーシス誘導能を有する vpr 発現ベクターの構築

アポトーシス誘導に必要な、VprのN末端から81番目までをコードするvpr遺伝子断片(C81)を、発現ベクターpHIV-LTRbsrに挿入した。このベクターとTat発現ベクターをHeLa細胞に共導入したところ、Tat蛋白によりC81蛋白の発現が誘導され、細胞はアポトーシスすることが確認できた。更に、単独で種々のHIV-1感染細胞に導入し、発現、アポトーシス誘導能等解析中である。

6) vpr 発現ベクターのリポソームへの封入のための予備実験

陽性荷電リポソームおよびモノクローナル抗体修飾リポソームによる遺伝子導入の有効性を検討した。まず、どの種類のどの形態の陽性荷電リポソームが高い遺伝子導入効率を示すか、また、遺伝子導入時に血清の存在が、遺伝子導入効率に影響を与えるかを解析した。種々の脂質(陽性荷電脂質、酸性リン脂質及び中性リン脂質)を用いて陽性荷電リポソームを作製し、COS1細胞を標的として、遺伝子導入効率をルシフェラーゼ活性を指標に調べた。その結果、N-(α -trimethylammonioacryl)-didodecyl-D-glutamate chloride (TMAG) リポソームが血清存在下においても細胞への遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。そのことから、*in vivo*の遺伝子治療に応用可能であること

が示唆された。

次に、モノクローナル抗体を結合させた遺伝子封入陽性荷電リポソームを構築し、その導入効率を調べた。抗体非結合リポソームや正常マウス IgG 結合リポソームに比べて、モノクローナル抗体結合リポソームにより pLTR-DT を導入した場合、標的細胞である KU-17 細胞の増殖が顕著に抑制された。一方、BLV 非感染細胞においては、増殖抑制効果は認められなかった。In vivo における抗腫瘍効果を検討するため、KU-17 細胞をヌードマウスに生着させ、モノクローナル抗体結合 pLTR-DT 封入リポソームを心臓内から投与し、細胞の増殖抑制について調べた。その結果、非処理のグループや正常マウス IgG を結合させたリポソーム処理グループに比べ、モノクローナル抗体結合リポソームにより pLTR-DT を投与されたグループにおいて、KU-17 細胞の増殖が顕著に抑制された。

5. 考察・まとめ

HIV-1vpr 遺伝子産物は、細胞の分化、アポトーシス、核局在、細胞周期を G2 期で停止する等、細胞に様々な効果を誘導する蛋白質であり、このような Vpr の機能はその幾つかのドメイン構造と密接に関わっている。我々は、Vpr のドメイン構造を欠失した変異体を用いた解析から、G2 期 arrest 能を消失しているにも関わらず細胞の増殖抑制活性を維持する変異体 C81 を見いだすことに成功した。この変異体の発見が、本申請の基本的なアイデア、即ち遺伝子を導入し発現させることによってアポトーシスを誘導するための材料提供を可能にした。しかしながら、Vpr は多機能な蛋白質であることから、アポトーシス活性以外の機能を完全に失活した変異体の作製が必須である。そのためにも、Vpr の機能を詳細に解析することが求められている。本研究において我々は、Vpr によって誘導される異なる2つの細胞増殖抑制機構の存在を明らかにした。即ち、G2 期 arrest およびアポトーシスである。更に、Vpr の leucine zipper 様 domain 中の4つの Leu/Ile 残基を Pro に置換した点変異体の解析から、Vpr の G2 期 arrest とアポトーシスとは、異なる経路を通じて発揮されることが明らかとなった。Vpr とアポトーシスとの関連性については、G2 期 arrest の後にアポトーシスが誘導される可能性、細胞内のごく低濃度の Vpr がアポトーシスの抑制に関与するといった知見、更に精製 Vpr を培養液中に添加するとアポトーシスが誘導される等の報告がなされている。従って、今回明らかになった C 末端欠失変異体によってアポトーシスが誘導されるという事実は、全長の Vpr を細胞内で発現させた時には G2 期 arrest に隠れて解析できなかった機能が実は発揮されている可能性を示唆する重要な成果である。

Vpr は細胞に対し様々な機能を発揮する。我々は、このような Vpr が示す多様な機能は Vpr と相互作用する細胞内因子と Vpr のユニークな構造に密接に関連していると考えている。AIDS の発症機構を解明するためにも、Vpr を大量に精製しその構造を解析することが必須と思われる。従って、本研究において我々は酵母発現系を用いて Vpr の発現と精製に成功したことは極めて重要であると思われる。また、本研究において、Vpr の yeast two-hybrid 法により、Vpr と相互作用する細胞内因子の幾つかを明らかにした。その中の一つである HHR23A の全長は yeast two-hybrid 法において Vpr との結合が殆ど見られなかったことから、この分子よりはむしろ UBA ドメインを有する他の分子が Vpr による G2 期 arrest に関与する、あるいは G2 期 arrest 以外の他の機能発現に関与している可能性が示唆された。今後は、得られたクローンが Vpr の何れの機能とどのように係わっているのかを解析する予定である。

本研究において、モノクローナル抗体結合リポソームは抗体非結合リポソームに比べ、in vitro、in vivo において標的細胞に対し高い遺伝子導入効率を示した。このことは、モノクローナル抗体を遺伝子封入リポソームに結合させることにより、目的遺伝子を標的細胞に効率良く導入できることを示している。また一般的に、陽性荷電リポソームはリンパ球系の細胞に対しては遺伝子導入効率が高くない。今回、モノクローナル抗体結合リポソームが、リンパ球系細胞である KU-17 細胞に対して高い遺伝子導入効率を示したことは、モノクローナル抗体結合リポソームが、リンパ球系細胞への効果的な遺伝子導入法となることを示唆している。また、本研究において、実験に用いた陽性荷電リポソームのいずれにおいても細胞への遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。しかしながら、遺伝子導入効率において、明らかな差が認められ、TMAG リポソームが一番高かった。その理由として、調べた陽性荷電リポソームのうち、TMAG リポソーム表面の陽性荷電が一番強い。このことが、陰性に荷電している細胞との相互作用を強め、細胞への遺伝子導入効率を高める結果になったものと考えられる。また、リポソームの形態の違いによっても遺伝子導入効率に差が認められたことは、細胞への遺伝子導入に用いるリポソームの形態も、遺伝子導入においては重要な因子であることを示している。さらに、遺伝子導入に対する血清の影響を調べた結果、TMAG リポソームにおいては血清存在下においても高い遺伝子導入が認められた。このことは、TMAG リポソームが、in vivo における遺伝子治療に応用できることを強く示唆しているものと思われる。

まとめ

- 1) Vpr によって誘導される異なる2つの細胞増殖抑制機構(G2 期 arrest、及びアポトーシス)の存在を明らかにした。
- 2) アポトーシス誘導に必要な領域は、Vpr の N 末端から 81 番目までであった。
- 3) これらの機能発現の機序を探るために、Vpr と相互作用する細胞内因子を同定した。
- 4) この領域をコードする vpr 遺伝子断片を発現ベクター-pHIV-LTRbsr に挿入し、Tat 蛋白により発現誘導可能な系を確立した。In vivo の遺伝子治療に応用するため、ベクター封入用のリポソームとして陽性荷電リポソーム(TMAG) が有効であること、更に、モノクローナル抗体結合リポソームが in vitro、in vivo において標的細胞に対し高い遺伝子導入効率を有する事が明らかとなった。
- 5) Vpr の3次元構造を解明するため、大量かつ細胞増殖抑制活性を保持した Vpr を産生する酵母株を得ることに成功した。更に、細胞内因子と結合した状態での Vpr の3次元構造を明らかにするため、Vpr 結合蛋白の一つである HHR23A と Vpr との結合ドメインを決定した。

6. 研究発表

1) 原著論文

1. Sugita S, Taguchi C, Takase H, Sagawa K, Sueda J, Fukushi K, Hikita N, Watanabe T, Itoh K, Mochizuki M.: Soluble fas ligand and soluble fas in ocular fluid of patients with uveitis. *Br J Ophthalmol.*, 2000, **84**, p1130-1134.
2. Nishizawa M., Kamata M., Katsumata R., and Aida Y.: A carboxy-terminally truncated form of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein induces apoptosis via G1 cell cycle arrest. *J. Virol.*, 2000, **74**, p6058-6067.
3. Trovato R, Cereseto A, Takemoto S, Gessain A, Watanabe T, Waldmann T.: and Franchini G. Deletion of the p16ink4a gene in ex vivo acute atll cells and methylation of p16ink4a promoter in HTLV-I-infected T-cell lines. *AIDS Res Hum Retrovirus*, 2000, **16**, p709-713.
4. Nishizawa M., Kamata M., Myojin T., Nakai Y. and Aida Y.: Induction of apoptosis by the Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 occurs independently of G2 期 arrest of the cell cycle. *Virology*, 2000, **276**, p16-26.
5. Kamata M., and Aida Y.: Two putative alpha-helical domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr mediate nuclear localization by at least two mechanisms. *J. Virol.*, 2000, **74**, p7179-7186.
6. Tajima S., and Aida Y.: The region between amino acids 245 and 265 of the Tax protein of bovine leukemia virus (BLV) restricts transactivation not only via the BLV enhancer but also via other retroviral enhancer. *J. Virol.*, 2000, **74**, p10939-10949.
7. Saito, M., Kono, H., Morii, H., Uedaira, H., Tahirov, T., Ogata, K., Sarai, A.: Cavity-filling mutations enhance protein stability by lowering the free energy of native state, *J. Phys. Chem.*, 104, 3705-3711, (2000).
8. Watarai, S., Tana, Inoue, K., Oguma, K., Naka, K., and Kodama, H.: Inhibitory effect of intestinal anti-globotriaosylceramide IgA antibody on verotoxin-induced cytotoxicity. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2000, **31**, p449-454.
9. Yamamoto, K., Mukamoto, M., Watarai, S., Kodama, H., Nakayasu, C., and Okamoto, N.: Induction of specific cytotoxic T cell activity in carp (*Cyprinus carpio*) against xenogenic target cells. *Am. J. Vet. Res.*, in press, (2001).
10. Tahirov, T.H., Inoue, T., Sasaki, M., Kimura, K., Morii, H., Fujikawa, A., Shiina, M., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S., Ogata, K., Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBFb, *Cell*, 2001, 104, 755-767.
11. Tahirov, T.H., Inoue, T., Sasaki, M., Shiina, M., Kimura, K., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Kamiya, N., Ogata, K.: Crystallization and preliminary X-ray analyses of quaternary, ternary and binary protein-DNA complexes with involvement of AML1/Runx-1/CBFa Runt domain, CBFb and the C/EBPb bZip region, *Acta Cryst.*, 2001, in press.

2) 学会発表

1. 磯貝まや、渡邊俊樹、間陽子：“HIV-1 Vpr と HHR23A UBA ドメイン との結合部位の解析および機能との相関”、第 48 回日本ウイルス学会、三重 (2000)。
2. 蒲田政和、間陽子：“HIV-1Vpr 蛋白には機構の異なる二つの核移行シグナルが存在する”、第 48 回日本ウイルス学会、三重 (2000)。
3. 石田尚臣、田中純、小岩司、安田二郎、長井正江、相沢繁美、岩倉洋一郎、渡邊俊樹：“潜伏 HIV 再活性化における LTR の CpG メチル化制御”、第 48 回日本ウイルス学会、三重 (2000)。
4. 小岩司、石田尚臣、長井正江、古賀震、相沢繁美、上平憲、渡邊俊樹：“HTLV の潜伏感染における LTR の CpG メチル化制御”、第 48 回日本ウイルス学会、三重 (2000)。
5. 渡辺卓郎、石田尚臣、鎌ヶ江裕美、古賀震、山口一成、渡邊俊樹：“組み替えアデノウイルスを用いた成人 T 細胞白血病の遺伝子治療の基本的研究”、第 48 回日本ウイルス学会、三重 (2000)。
6. 磯貝まや、渡邊俊樹、間陽子：“HHR23A UBA ドメインと結合する HIV-1 Vpr のドメインの同定および機能との関連”、第 14 回日本エイズ学会、京都 (2000)。
7. 蒲田政和、間陽子：“HIV-1Vpr 蛋白核移行機序”、第 14 回日本エイズ学会、京都 (2000)。
8. 石田尚臣、田中純、小岩司、安田二郎、長井正江、相沢繁美、岩倉洋一郎、渡邊俊樹：“潜伏 HIV 再活性化における LTR 領域の CpG 脱メチル化の意義”、第 14 回日本エイズ学会、京都 (2000)。

平成12年度

エイズ医薬品等開発研究
研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社

