

V3-BH10 EINCTRPNNNTRKSIIRIQRGPGRAEFTIGKI GNMQRQAHCNIS
V3-BH10/CA ...A.....A...
V3-89.6 ESVV.....RRLS.....YARRN.I.DI.....
V3-ADA H.....Y.T.E.I.DI.....

Fig 1 The Amino acid sequences of V3 peptides

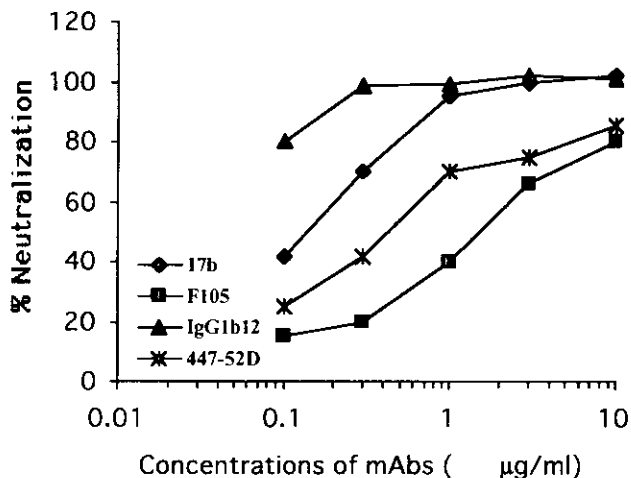


Fig. 2 The neutralizing characters of mAbs CD4i or anti-CD4BS to H9IIIB cell.

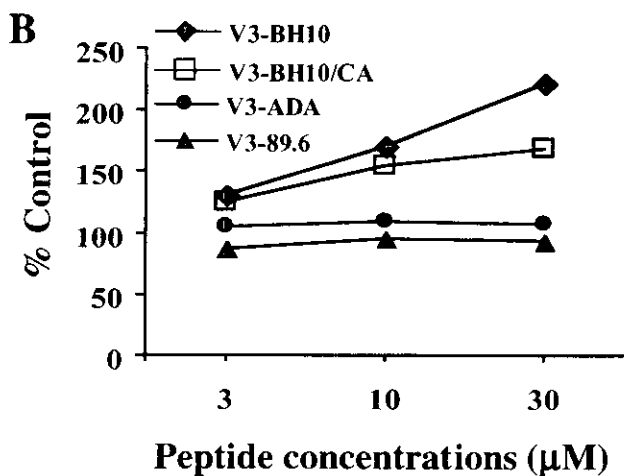
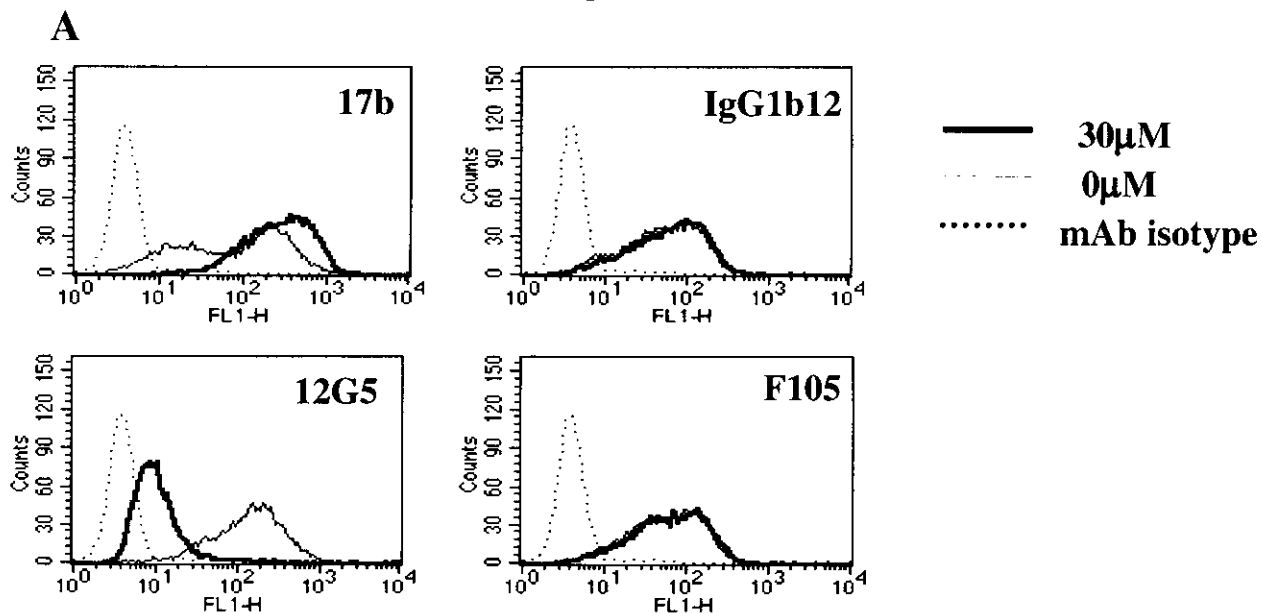


Fig.3 Influence of V3-BH10 on mAb 17b binding. A. BH10 on different mAbs. B. V3 peptides on mAb 17b binding.

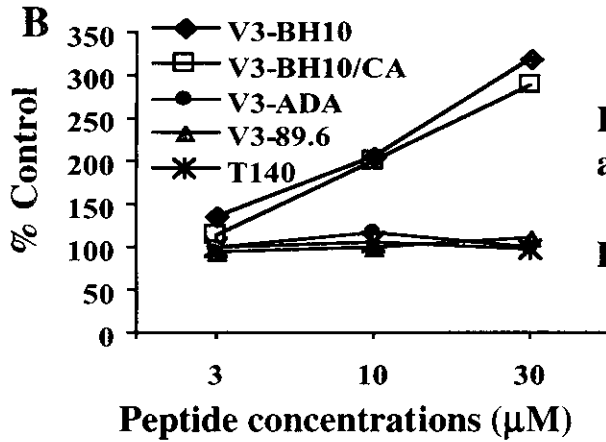
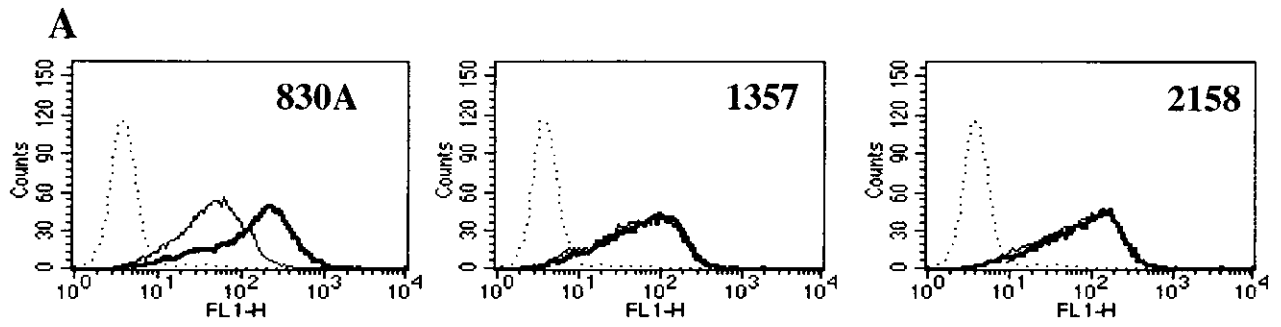


Fig.4 Influence of V3-BH10 on V2 antibody binding. A. BH10 on V2 mAbs. — 0μM — 30μM B. V3 peptides on mAb 830A binding.

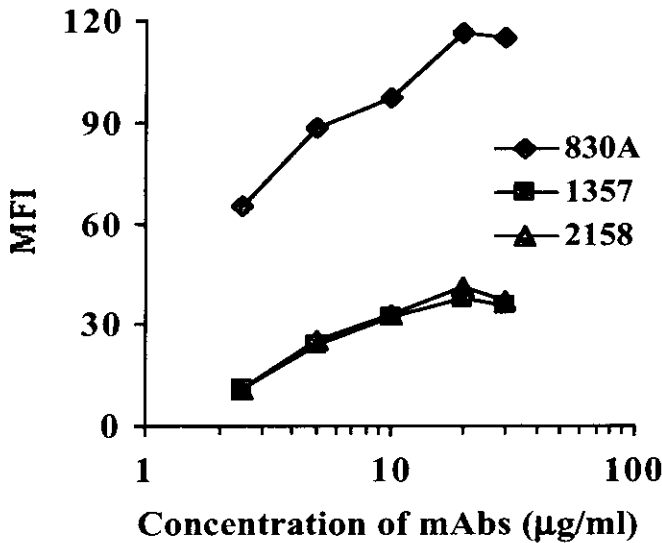


Fig. 5 The binding characters of mAb anti-V2 to gp 120 of H9IIIB cell.

B1-subtypeB 1 CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGGEIIGDIRQAHC 35
SDA1 1R.TM....VY....G.V..... 35
 Net Charge: +5
 Coreceptor usage: Not predictable

Fig 6 amino acid sequence of V3 region of filed isolate

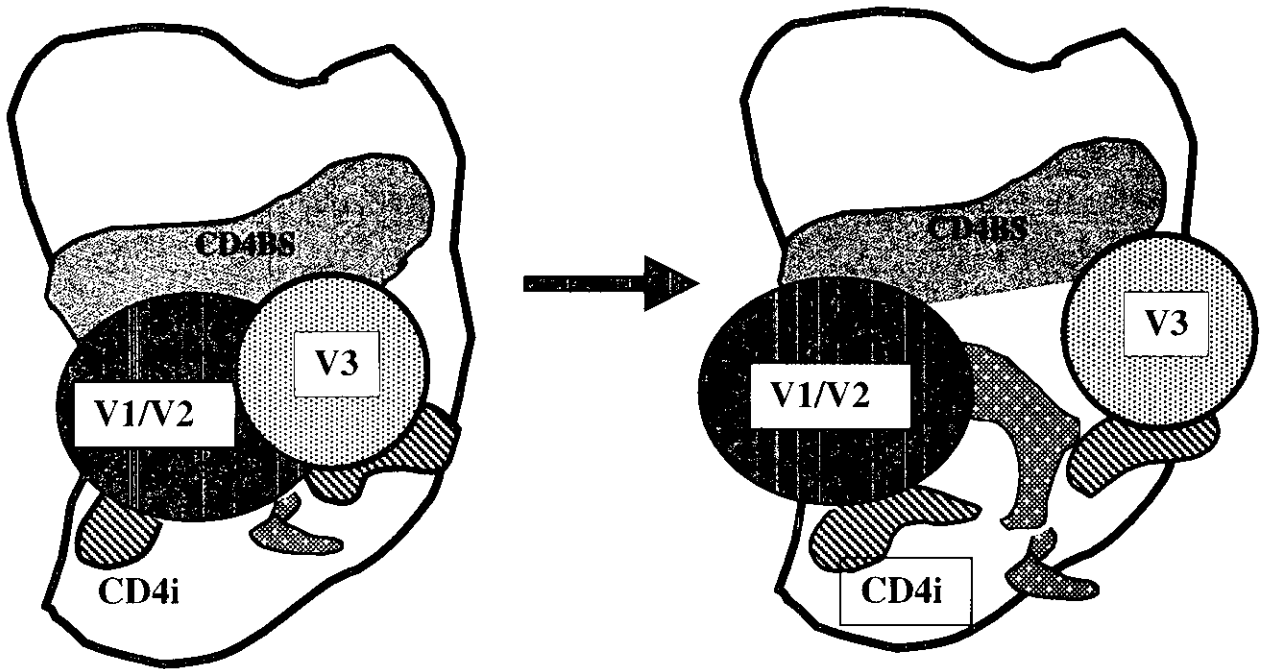


Fig 7. A model of V1/V2 and V3 interaction

4. 厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究者報告書

HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究

分担研究者 庄司省三 熊本大学・薬学部・生化学 教授

研究要旨：HIV-1 coreceptor CCR5 の Arg168—Cys178 から構成される特殊立体構造を Undecapeptidyl arch(UPA)と名づけ、この特殊立体構造をミミックした Cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate(cDDR5-MAP)を調製した。cDDR5-MAP 抗原によって誘導される単クローン抗体(KB8C12)は直鎖状 Undecapeptide(Arg168—Cys178)とは反応せず、同ペプチドの head and tail の酸・アミド結合を介して環化された特殊立体構造を認識した。本抗体は細胞表面に発現している CCR5 の特殊立体構造 (UPA) と特異的に反応して HIV-1 R5 ウイルスの感染を強力に阻害した。cDDR5-MAP 抗原は CCR5 の UPA に対する特殊抗体を誘導し、HIV-1 の感染を防止するワクチンとして有用であると考えられる。

A 研究目的

「HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」の一貫として、分担研究者らは「HIV-1 coreceptor を基礎にした吸着・侵入・増殖制御法の開発」に携わってきた。分担研究者らは視点を換え、生体側の因子に眼を向け、HIV-1 の侵入に必須な HIV-1 の coreceptor (CCR5)の第2細胞外 domain の一部を構成する特異的立体特殊構造(UPA)に注目した。この UPA domain は HIV-1 の侵入に必須な domain と考え、従来のワクチンの基本概念を逸脱して、**生体の守りを固め、ウイルス侵入を防止する手段を考えた。**この特殊構造を構成する 11 アミノ酸残基から Cys 残基を除いた 10 アミノ

酸残基に、スペーサーアームジペプチド (Gly-Asp あるいは Gly-Glu) を挿入して環状 dodecapeptide として再構築し、multiantigen peptide (MAP)に結合させ、免疫抗原として用いた。この抗原(ワクチン)によって誘導される特殊抗体はウイルスの侵入から生体を守る能力を有すると考えられ、HIV-1 coreceptor を基礎にした吸着・侵入阻止法の開発及び増殖制御法の開発のための研究を遂行することによって、所期の目的である「HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」を達成することができる。

B 研究方法

1) cDDR5-MAP の調製

HIV-1 coreceptor CCR5 の Arg168-Cys178 から構成されペプチドから Cys を除き、スパーサーアームジペプチド (Gly-Asp あるいは Gly-Glu) を挿入してペプチド合成機で合成した後、同ペプチドの head and tail の酸・アミド結合を介して環化させ、スパーサーアームジペプチドのカルボキシル基と MAP のアミノ基を結合させたのち、脱保護をして cDDR5-MAP を調製した。

2) 単クローン抗体の作出及び精製。

cDDR5-MAP に対する単クローン抗体 (KB8C12) は常法どおりに、調製し、精製して用いた。

3) 抗体の諸性質

得られた抗体の免疫化学的諸性質をピアコア、フローサイトメーターを用いて調べた。

4) ケモタキシス活性の測定

トランズウエルを用いてケモカイン(MIP-1 β)により誘導されるケモタキシス活性を常法により求めた。

5) 抗 HIV 活性の測定

MAGIC-5 Cell を用いて、抗体あるいはエフェクター存在下あるいは非存在下 HIV-1(R5,X4 ウイルス)を感染させて、感染によって生じるブルー細胞の数を顕微鏡下計測して抗 HIV-1 活性を調べた。

実験動物に対する動物愛護上の配慮については、必ず所属施設の倫理委員会等に置いて審査を受け、本実験を行った。

C 実験結果及び考察

HIV-1 coreceptor CCR5 の UPA をミミクした cDDR5 環状ペプチドの MALDI-TOF MS の結果を Fig.1 に示す。同ペプチドの head and tail

の酸・アミド結合を介する環化が質量分析によって確認され、スパーサーアームジペプチドのカルボキシル基と MAP が結合した cDDR5-MAP の確認が質量分析によって再確認された。

cDDR5-MAP を抗原として作出された精製単クローン抗体 KB8C12 はピアコア分析の結果 (Fig. 2)、環状の cDDR5-MAP を認識し、直鎖状の DDR5-MAP とは反応しなかったことから、本抗体は環状になったペプチドの立体構造を識別する立体特異的抗体と考えられる。本抗体はまた、細胞膜表面に発現している CCR5 と特異的に反応することがフローサイトメーターの分析の結果 (Fig. 3, 4) により明らかになった。このことから、本抗体は receptor CCR5 の UPA と反応していると考えられる。ケモタキシス活性測定の結果 (Fig. 5)、本抗体は MIP-1 β によって誘導されるケモタキシスを阻害した。MAGIC-5 assay の結果、0.8 nM の濃度で HIV-1 の感染を約 90% 抑制することがわかった (Fig. 6)。

1997 年にクリントン前アメリカ大統領はワクチン開発に国をあげて着手することを宣言し、世界各国でウイルスタンパク質を基礎にしたワクチン、弱毒したウイルスワクチン、CTL 活性誘導体ワクチン、HIV-1 Tat ワクチン、ウイルス受容体結合ワクチン等が開発され始めた。しかし、1999 年はじめに、エイズワクチン開発の困難さが改めて再認識された。

1996 年 5 月に coreceptor の発見が報じられて以来、約 1 年後に HIV-1 coreceptor に変異を有するコーカサスの数%の人々は HIV-1 感染に対して抵抗性であることが遺伝子解析の結果判明した。

また、イタリアにおけるコホート研究の結果、CCR5 に対する自己抗体保持者はセックスパートナーがエイズ患者にもかかわらず、HIV-1 に感染しないことが報告され、さらに、分担研究者らの報告に前後して、健康成人混合血清から CCR5 のアミノ末端ペプチドに反応する IgG が高濃度 (約 3,000nM) ではあるが HIV-1 の感染を防止することが分かり始めた。このことは HIV-1 coreceptor を修飾することにより、HIV-1 感染を防止を達成出来ることを示している。

D. 結論並びに将来への展望

HIV-1 coreceptor (CCR5)の全一次構造から立体構造を推定し、第2細胞外ループ (ECL-2)膜貫通ドメインから細胞外の第1のアミノ酸残基 Arg 残基から11番目の ECL-1 と SS 結合を形成している Cys 残基の領域 (undcapeptidyl arch, UPA) に注目した。UPA の構造解析の結果、UPA は特異的立体特殊構造であり、HIV-1 侵入に関与すると推定され、この11残基からCysを除き、Gly-Asp あるいは Gly-Glu のスペーサーペプチドを挿入して環状化することによって、この特異的立体特殊構造を再構築した。本特殊構造ペプチドに対して単クローン抗体が得られ、HIV-1 R5 ウイルスの感染を低濃度 (約 0.8 nM) で、ほぼ完全に阻止した。HIV-1 初感染防止に HIV-1 coreceptor を基礎にした生体の守りを固めるためのワクチン開発に本研究の特色・独創性があり、従来の治療薬・ワクチンの概念・考えを超越した本研究が HIV-1 研究のブレイクスルーとなりうる。

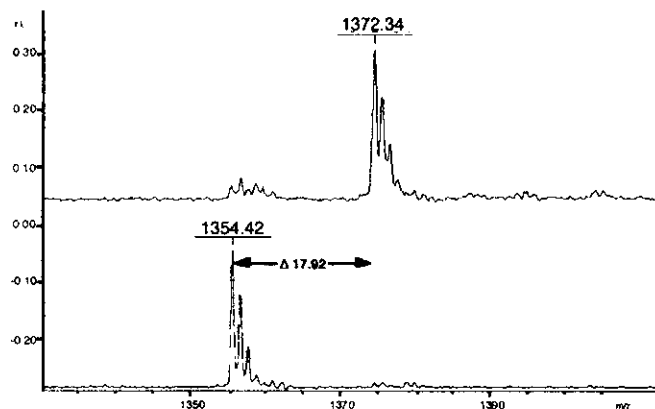


FIG. 1. MALDI-TOF MS spectrum of linear DDR5 and cDDR5. The spectra exhibited two peaks at m/z 1372.34 and 1354.42: the upper peak is that of the ion derived from linear DDR5, and the lower peak is that of the ion derived from cDDR5. The matrix was a saturated solution of α -cyano-4-hydroxybenzoic acid in a solution of acetonitrile-water (1:2) containing 0.1% trifluoroacetic acid. The fraction with a molecular mass of 17.92 corresponding to H_2O was deleted after cyclizing the head and tail of the peptide.

Immunochemical specificity of anti-cDDR5-MAP μ monoclonal antibody, KB8C12.

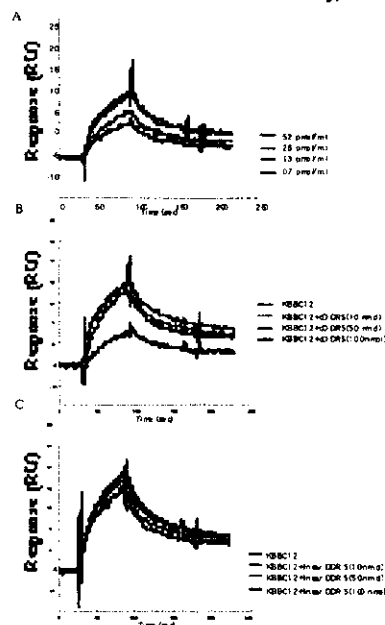


FIG. 2. Immunochemical specificity of the anti-cDDR5-MAP μ MAb KB8C12. The binding specificity of KB8C12 was determined by real-time biomolecular interaction analysis using surface plasmon resonance with a BIACore biosensor. Aliquots of the deproteinated cDDR5 with the free B-carboxyl group of Asp, were used for the construction of biotinylated cDDR5 as described in Materials and Methods. Antigen-antibody binding and competitive experiments were carried out with purified KB8C12 alone (0.7, 1.3, 2.6, or 5.2 pmol/ml) (A) or with the antibody treated without (KB8C12 alone; 5.2 pmol/ml; black line) (B) or with cDDR5 (10, 50, or 100 nmol) (B) or linear DDR5 (10, 50, and 100 nmol) (C) using the biotinylated-cDDR5-bound BIACore biosensor.

Flow cytometry of NP-2 transfectants with KB8C12.

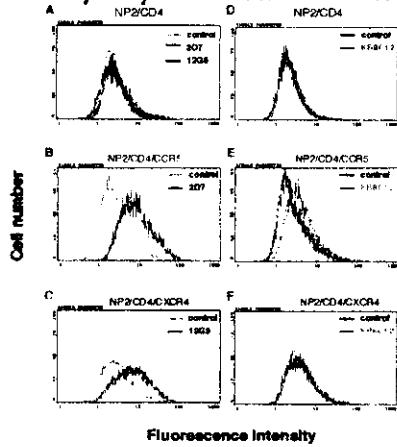


FIG. 3. Flow cytometry of NP-2 transfectants with KB8C12. NP2/CD4 (A and D), NP2/CD4/CCR5 (B and E), and NP2/CD4/CXCR4 (C and F) were first detached by incubation in PBS containing 0.25% trypsin at 37°C for 1 min and then suspended in a cold washing buffer (PBS containing 2% fetal calf serum and 0.02% NaN₃) at 10⁶ cells/ml. These were subjected to flow cytometry as described in Materials and Methods, in which cells were separately incubated with 12G5 (1 µg; black line in Fig. 4A and C), 2D7 (1 µg; dark gray line in Fig. 4A and black line in Fig. 4B), KB8C12 (1 µg; light gray line in Fig. 4D, E, and F), an isotype-matched IgG antibody (control; 1 µg; light gray line in Fig. 4A, B, and C), or an isotype-matched IgM antibody (control; 1 µg; black line in Fig. 4D, E, and F) at 4°C. Then the cells were washed with the washing buffer and resuspended in the washing buffer containing FITC-conjugated anti-mouse IgG or anti-mouse IgM.

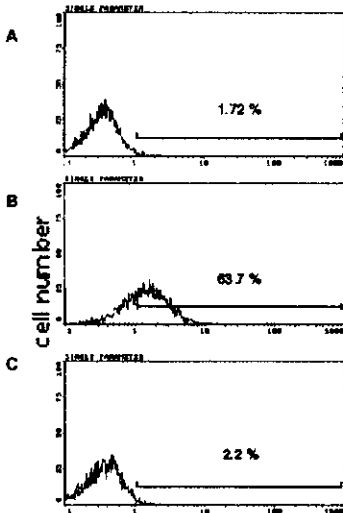


Fig. 4 KB8C12 binds specifically to CCR5 on the cell surface. THP-1 cells were exposed to KB8C12 (0.05 µmol/l) in the absence (B) or presence (C) of cDDB5-MAP (0.5 µmol/l), or in the presence of an isotype-matched control antibody (A) at 4°C. Bound cells were observed within the reaction in each histogram.

KB8C12 interferes with MIP-1β-induced THP-1 chemotaxis.

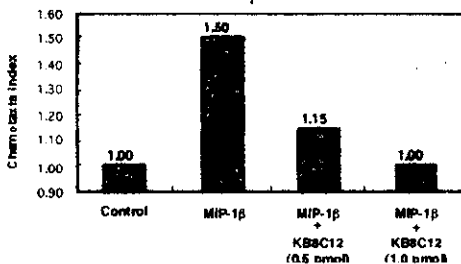


FIG. 5. KB8C12 interferes with MIP-1β-induced THP-1 chemotaxis. KB8C12 inhibits the THP-1 chemotactic response in a dose-dependent manner. Results are expressed in terms of the chemotaxis index, which represents the fold increase in the number of cells migrating in response to MIP-1β over the number migrating spontaneously in the control medium.

Antiviral activities of KB8C12

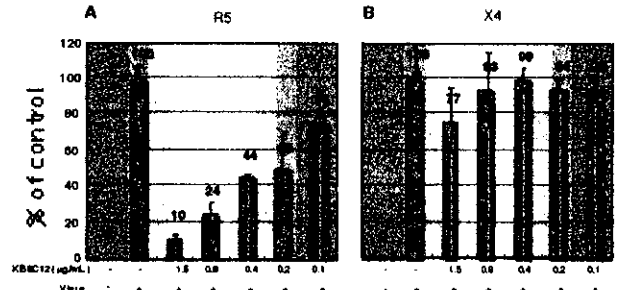


FIG. 6. Antiviral activities of KB8C12. MAGC-5 cells were separately incubated with HIV-1 strains JRFL (amount of HIV-1 p24 antigen, 5.6 ng) (A) and LAV-1 (amount of HIV-1 p24 antigen, 56 ng) (B) and cocultured in the KB8C12-containing medium (400 l) for 48 h as described in Materials and Methods. No significant cytotoxicity of the antibody-containing medium was observed. Values are means of triplicate determinations.

E. 研究発表

五百十二 論文発表

- 1) Shogo Misumi, Reina Nakajima, Nobutoki Takamune, and Shozo Shoji, A cyclic dodecapeptide-multiple-antigen-peptide-conjugate from undecapeptidyl arch (from Arg168 to Cys178) of extracellular loop2 in CCR5 as a novel HIV-1 vaccine., *J. Virol.* 75, 11614-11629, 2001.
- 2) Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Yasuhide Ido, Shinichiro Hayashi, Masafumi Endo, Ryouzaburo Mukai, Kuniomi , Tachibana, Mamoru Umeda, and Shozo Shoji, Evidence as a HIV-1 self-defense vaccine of cyclic chimeric dodecapeptide warped from undecapeptidyl arch of extracellular loop 2 in both CCR5 and CXCR4., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 1309-1316, 2001.
- 3) Nobutoki Takamune, Tadahiro Tanaka, Hiroki Takeuchi, Shogo Misumi, and Shozo Shoji, Down-regulation of N-myristoyl transferase expression in human T-cell line CEM by human immunodeficiency virus type-1 infection., *FEBS Lett.* 506, 81-84 (2001)
- 4) Takatoshi Shiraishi, Shogo Misumi, Michiho Takama, Ichiro Takahashi, and Shozo Shoji,

Myristoylation of human immunodeficiency virus type-1 gag protein is required for efficient env protein transportation to the surface of cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 282, 1201-1205 (2001)

-2141126584 学会発表

- 1) Shozo Shoji. Novel strategies for HIV vaccine /-Development of HIV-1 coreceptor-based vaccine-, US-JAPAN joint symposium on chemistry-biology interface Bioscience symposium in Kumamoto University 2001, July 27-28, 2001 Abstracts 15 (2001)
- 2) Takaaki Iiboshi, Reina Nakajima, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Shozo Shoji. The development of a new candidate vaccine based on HIV-1 coreceptor CCR5. 2nd AIDS seminar in Kumamoto, September 20-21, 2001. Abstract 34
- 3) Daisuke Nakayama, Shinichirou Hayashi, Ryouzaburo Mukai, Kumiomi Tachibana, Mamoru Uneda, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Shozo Shoji. Usefulness as a HIV-1 self-defense vaccine of cyclic chimeric dodecapeptide (cCD)-mimicked from extracellular loop2 (ECL2) in chemokine receptor (CCR5 and CXCR4). 2nd AIDS seminar in Kumamoto, September 20-21, 2001. Abstract 34
- 4) Masafumi Endo, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Shozo Shoji. Anti-HIV activity of novel monoclonal antibody induced by cyclic dodecapeptide which mimic the conformational specific domain of chemokine receptor, CXCR4, 2nd AIDS seminar in Kumamoto, September 20-21, 2001. Abstract 42
- 5) 飯干高明, 中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三

三, CCR5 由来合成環状 dodecapeptide を免疫抗原として調製した単クローン抗体の免疫化学的諸性質の検討, 生化学, 73, 1033 (2001)

- 6) 遠藤昌史, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三, CXCR4 の特異的構造を基礎にした HIV-1 X4 ウイルスの感染防御法の開発, 第 15 回日本エイズ学会術集会・総会抄録集 423 (2001)
- 7) 中山大介, 林辰一郎, 向井隼三郎, 橘圀臣, 梅田衛, 高宗暢暁, 三隅将吾, 庄司省三, Chemokine receptor を基礎にした HIV-1 dual tropic ウイルスの感染を防止する単クローン抗体の調製および性質, 第 15 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 423 (2001)
- 8) 飯干高明, 中島玲奈, 三隅将吾, 高宗暢暁, 庄司省三, HIV-1 coreceptor, CCR5, の細胞外第 2 ドメイン由来環状 dodecapeptide (cDDR5) の抗 HIV-1 活性及び cDDR5 に対する単クローン抗体 KB8C12 の免疫学的諸性質の検討, 第 15 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 422 (2001)
- 9) 庄司省三, 三隅将吾, 高宗暢暁, HIV-1 coreceptor を標的とした defense vaccine 開発のための生化学的基礎研究, 第 49 回日本ウイルス学会学術集会・総会抄録集, 79 (2001)

F. 特許

庄司省三 環状ペプチド及びエイズワクチン

出願人：日水製薬株式会社

国際公開番号、出願番号：WO00/47609、PCT/JP99/06174

出願日：1999年5月11日

5. 厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究）
分担研究報告書

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株で作製し、変異ウイルスは、野生株ウイルスと同様にマクロファージに侵入するにも拘わらず、ゲノムRNAの逆転写の過程でウイルス複製の制限を受けていることを示した。これにより、V3領域のRNA塩基配列自体が逆転写効率を支配する重要な因子の1つであることも明らかにした。

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

みを変換したサイレント変異JRFL感染性DNAクローンは、昨年度作製したものをを用いた。ウイルスはDNAクローンを293T細胞にトランスフェクションした培養上清から調整した。これらウイルスの感染・複製効率は、感染させた細胞の培養上清中p24 ELISA量により測定した。また、CD4, CCR5, CXCR4陽性MAGI5細胞を用いたMAGIアッセイで感染価も測定した。感染に用いるヒト由来primary細胞にはPBMCより調整した付着性細胞と非付着性細胞を用いた。マクロファージは付着性細胞をM-CSF存在下で1週間分化させ、リンパ球は非付着性細胞をPHAで3日間rIL-2で一晩刺激したものをを用いた。ウイルス構成蛋白の解析は、HIV感染者血清を用いたウイスタンブロットティングで行った。

A. 研究目的

HIVのリザーバーであるマクロファージはCD4, CXCR4, CCR5陽性にも拘らず、R5 HIV(M-tropic)のみが増殖し、X4 HIV(T-tropic)の複製効率は極めて低い(restriction)。両者のEnvV3領域を交換すると、R5 HIVはマクロファージ感染性を失い、X4 HIV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領域にある事を示唆している。しかし、このrestrictionにはHIV侵入制限説と侵入後のHIV複製制限説があり、混沌としている。また、HIVが正常に侵入できたとしても、マクロファージ内でHIV複製が制限される機序は不明のままである。そこで本研究では、V3領域のアミノ酸変異を伴わず侵入が影響されない、サイレントV3変異M-tropic R5 HIVを作製し、V3塩基配列がマクロファージでの複製制限の重要な因子の1つであることを示してきた。本年度はこのサイレント変異のHIV複製に及ぼす機序の解明を目指した。

B. 研究方法

M-tropic R5 HIV・JRFL株DNAクローンのV3領域アミノ酸配列を変化させずに、塩基配列の

(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. 研究結果及び考察

HIV RNAゲノムはアデニン(A)含量が異常に高く、そのバイアスによりA-richコドン使用頻度がgag, pol遺伝子において異常に高いことが、HIVの分離された当初のコンピューター解析により示されていた。そこで、本研究に用いたJRFL株env遺伝子のコドン使用頻度を解析したところ、Aを含むコドンを選択できる12アミノ酸のうちグルタミンを除いた11アミノ酸でA-richコドン使用が優勢であった。しかし、サイレント変異株及び代表的なR5, X4

各5クローンのenv遺伝子におけるA-richコドン使用頻度を比較しても、R5, X4の両者に差異はなく、かつ、JRFL野生株とサイレント変異株の差異は、R5, X4各クローンのコドン使用変動範囲であった。また、コドン使用頻度による影響であれば、mRNAの翻訳レベルでバイアスがかかり、ウイルス粒子表面のEnv蛋白分子数の多寡に反映されるはずである。しかし、変異株のウイルス粒子を精製し、2種の抗体を用いてEnv蛋白を解析してみても、量的あるいは質的な変化は認められなかった。これらの結果は、マクロファージにおける複製効率の違いがコドン使用頻度の違いに依るものではないことを示唆している。

HIV RNAゲノムでは、LTRだけでなくgagからnefに至る全領域中に遺伝子発現に係わるstem-loop構造が分布している可能性が報告されている。従って、ウイルス複製効率に係わるような構造がV3領域内に存在する可能性も考えられる。そこで、RNA2次構造を解析した結果、確かにJRFL野生株V3は比較的緩い(-17.17Kcal/mol)塩基対構造を形成し、マクロファージにおける複製効率の悪い変異株2種では安定な(-21.81 Kcal/mol, -22.11 Kcal/mol)構造を形成することが推計された。しかし、野生株と同等の複製効率を示す別の変異株は、中間の2次構造(-19.81Kcal/mol)と計算され、必ずしも感染・複製効率と一致するものではなかった。

JRFL野生株とサイレント変異株の感染・複製の差異はprimaryマクロファージで認められ、HeLa細胞由来のMAGIC5細胞や293T細胞などでは両者の違いが検知できない。従って、変異導入によって生じる差がヒトprimary細胞と株化細胞の違いを反映している可能性も考えられる。そこで、マクロファージと同一の提供者からリンパ球を調整し、野生株と変異株の感染効率を比較した。その結果、マクロファージでは低い感染・複製しか示さないサイレント変異株も、primaryヒトリンパ球では旺盛に複製し、その増殖曲線はJRFL野生株とほぼ同様のパターンを示した。

次に、マクロファージではウイルス複製のどのステップが制限されているか、逆転写の

前か後か、ウイルスDNAの合成をPCRで解析した。まず、R/U5プライマーで逆転写初期DNA合成を検討したところ、野生株も変異株もT-tropicNL43株もマクロファージ感染2時間でDNAバンドが認められた。しかも、感染24時間、48時間後でも野生株・変異株ともに明瞭にバンドが検出された。この結果は、変異ウイルスがマクロファージに侵入し、逆転写を正常に開始できることを示唆している。これに対して、感染後時間経過と共に検出されるようになる全長ウイルスDNAをLTR/gagプライマーで検討したところ、感染48時間のマクロファージで検出される変異ウイルスのDNAシグナル強度は顕著に低下していた。また、核内に移行後形成される2LTRの環状DNAも同様に変異株では低下していた。

以上の結果は、マクロファージにおけるHIV複製の制限が感染初期の逆転写のステップで生じていることを示している。また、V3塩基配列自体が逆転写効率に影響する因子の1つであることも明らかになった。ウイルスRNAゲノムのV3領域塩基配列がどのようなメカニズムで逆転写の効率を制限しているか、今後詳細に検討を加えたい。

D. 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の変異ウイルスは、野生株ウイルスと同様にマクロファージに侵入するにも拘わらず、ゲノムRNAの逆転写の過程でウイルス複製の制限を受けていることを示した。また、V3領域のRNA塩基配列自体が逆転写効率を支配する重要な因子の1つであることも明らかにした。

E. 健康危険情報

該当事項無し。

F. 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* 45, 495-501, 2001.

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.* 82, 813-820, 2001.

2. 学会発表

1) 三浦秀佳、横幕能行、建石幸子、後藤美江

子、立川愛、岩本愛吉、小島朝人、有吉紅也：HIV特異的細胞障害性T細胞(CTL)による臨床株Gagタンパクの認識効率に関する研究。第49回日本ウイルス学会総会、2001年11月、大阪。

2) 北川善紀、原田貴之、千葉丈、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：HIV-1 Gag-VLP抗原発現系を組み合わせた最適なブライム・ブースト免疫法の検討。第49回日本ウイルス学会総会、2001年11月、大阪。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項無し。

6. HIV-1Vpr蛋白核移行の分子機構に関する研究

分担研究者 間 陽子 (理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニットリーダ)
共同研究者 蒲田 政和、庄 文忠
(理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット)

研究要旨 HIV-1Vpr の2つの α -helix ドメイン (17-34 位: α H1、46-74: α H2) の内、 α H1 が核膜から核内への移行に、 α H2 が核膜への targeting に寄与することを明らかにした。また、Vpr は塩基性核局在化シグナル (NLS) のレセプターである Importin (Imp) α 及びそのアダプター分子である Imp β と α H2 を介して直接結合すること、さらに、Imp α と α H1 を介して間接的に結合することを立証した。Vpr の核移行の最小機能ドメインである N17C74 は、単独で核膜結合しうるが核内へと効率よく移行するためには Imp α 或はエネルギーが必要であった。次に、核膜孔複合体の構成分子である Phe-Gly(FG)リピートを有する核膜孔蛋白 (nucleoporin)である p62、POM121 および Nup153 存在下でN17C74 を用いて nuclear import assay を行った。その結果、Vpr は nucleoporin を介して核膜に結合すること、この核膜結合には Imp α との直接結合は必要ないことが示された。さらに、Vpr の核移行には α H1 介した Imp α との間接結合と phenylalanine-glycine(FG) repeat を有する nucleoporin を介した核膜結合とが共に必須であることを明らかにした。

このようにVprによる核移行は極めて特徴的である。これまでに知られている核移行能を有する蛋白はImp α を介してImp β に結合するか、あるいはImp β との直接結合を介してnucleoporinと結合後に核移行する。VprのようにImp α によって核移行が制御される分子の報告は初めてである。このことは、Vprを標的にしてHIV-1 preintegration complex (PIC)の核移行を制御できることを示唆していると思われる。

A. 研究目的

HIV-1アクセサリ遺伝子の一つである *vpr* 遺伝子産物は、AIDS患者の血清中に多量に存在し、ウイルス感染効率の上昇およびHIV潜伏感染細胞からのウイルス産生を惹起するなど、AIDS発症のkey factorとして注目されている。また、Vpr蛋白はPICを形成することにより、マクロファージ等の非分裂細胞においてウイルス核酸の核移行を促すことも示された。さらに、リンパ球系細胞をG2期でarrestすること、細胞の分化、多倍体化、アポトーシスを誘導することも明らかになった。興味深いことに最近、Vpr蛋白がHIV感染細胞をG2期でarrestさせ

る結果として、ウイルスの複製効率を著しく高めること、さらに、可溶化Vpr蛋白をHIV非感染細胞に添加すると、アポトーシスが誘導されることが証明された。これらの事実は、Vpr蛋白がHIV感染細胞の細胞周期を制御することによりウイルス複製を調節し、さらに、HIV非感染CD4陽性T細胞をアポトーシスにより破壊する可能性を強く示唆している。このようなVpr蛋白の機能は細胞内因子と結合することにより発揮されるものと考えられる。事実、Vpr蛋白結合性細胞内因子として、核移行に関与するものとしてimportin α 、核膜孔蛋白 POM121、Nup1p及びNsp1p、およびDNA除

去修復機構関連分子HHR23Aなどが報告されている。しかし、Vpr蛋白とこれらの分子がどのように相互作用して多様な機能を発揮するのかは不明である。また、核移行以外の機能に関与する細胞内因子の同定はなされていない。

本研究では、HIV-1 PICの核移行の阻害技術の開発を最終目標に、Vpr蛋白と相互作用する核内輸送担体及び核膜孔蛋白を同定し、それらとVpr蛋白との相互作用を介して制御されるVprの核移行機序の全容解明を目指す。

B. 材料と方法

1) HIV-1 感染性DNAクローンpNL432の欠失変異体及び点変異を含む遺伝子断片をPCR法により増幅後、Flag配列を連結したpME18Neo発現ベクター及びEGFP発現ベクター (pEGFP-N1) に挿入した。これらをelectroporation法によりHeLa細胞に導入し24時間培養後、抗Flag抗体及びCy3結合二次抗体で蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

2) Vpr蛋白とImp α 1、 α 2及び β 1との結合の有無をpull-down assayにより検討した。N末端側にGSTを持つ組換え型ヒトImp α 1 (GST-NPI-1)、マウスImp α 2(GST-PTAC58)及びマウスImp β 1(GST-PTAC97)をE. coli BL21(DE3)株で発現させ、glutathione (GSH)-Sephrose beadsにて回収した。野生型及び各種変異型Vpr蛋白、或いはVprの2つの α -helixドメインとGFPとの融合蛋白(α H1-GFP及び α H2-GFP)をin vitro translation或いは酵母発現系で調製した。

3) 核移行解析はDigitonin処理HeLa細胞を用いたnuclear import assayで行った。組換え型Imp α 、Imp β 、p62、POM121及びNup153のN末端側にGSTを持つ融合蛋白として大腸菌に発現させた。Imp α 及びImp β はproteaseにてGSTを切断除去した。Vprの各ドメイン及びそれらの点変異体のN末端側にGST、C末端側にGFPを持つ融合蛋白

として調製した。エネルギー供与系としてはcreatine phosphokinase、creatine phosphate及びATPを加えたものを使用した。

C. 研究結果

1) Vprの核移行に重要なドメイン構造の決定

Vpr蛋白は、 α -helix、ロイシンジッパー様、アルギニンに富むドメインから構成されている。我々はVpr蛋白の核局在に関するドメインを同定するために、Vprの α -helix 1 (α H1) 及び α -helix 2 (α H2) の二つのドメインの点変異体を作成してpME18Neo発現ベクターに挿入後、それらの細胞内局在を観察した。野生型Vprは主として核及び核膜、そして一部細胞質にも局在するが、 α H1及び α H2の二つのドメインの点変異体、 α LA (α H1変異体) 及びL67P (α H2変異体) では、Vprの核移行能は部分的に影響された。二重変異体 (α LA/L67P) では、Vprの核移行は完全に阻害された。以上の結果から、Vprの核移行には二つの α -helix領域が共に重要であることが明らかになった。

Vprの細胞内局在を規定する最小領域を決定するため、N末端及びC末端の種々の欠失変異体を作製し、それらの細胞内局在を観察した。その結果、N末端16アミノ酸及びC末端25アミノ酸を欠失した変異体N17C74が、核及び核膜局在を示す最小領域であることが明らかになった。

次に、この領域に含まれる二つの α -helixドメインを各々EGFPに連結し、その細胞内局在を観察した。 α H1をEGFPに連結した α H1-EGFPは核に局在し、その局在様式はSV40 Large T抗原由来のNLSをEGFPに連結したものと類似していた。一方、 α H2を連結した α H2-EGFPは主として核に局在していたが、 α H1-EGFPとは異なり、細胞質にも分布していた。Vprの核局在に重要な60位のIle或いは67位のLeuをProに置換した変異体 (I60P/ α H2-EGFP、L67P/ α H2-EGFP)

では、 α H2の核局在能は著しく低下していた。また、L67P点変異体のN末端29アミノ酸を欠失させたN30-L67Pでは核局在能を完全に消失していた。

以上の結果はVprの核局在能には2つの α -helixドメインが共に重要であることを示唆している。さらに α H1-EGFPと α H2-EGFPが異なる細胞内局在を示したことから、二つの α -helixドメインは互いに異なる細胞内因子と結合する可能性が示唆された。

2) Vpr蛋白と相互作用する核内輸送担体の解析

in vitro translation及び酵母発現系で作製した野生型Vpr蛋白を用いてpull-down assayを行った(図1)。何れの方法で作成したVpr蛋白もImp α 1、 α 2及び β 1と結合した。従って、これらはVprと直接結合している可能性が示唆された。次に、変異型Vpr蛋白をin vitro translationにより調製し、これらを用いてImp α 2或いは β 1との結合に必要なVpr蛋白側のドメインの同定を試みた。 α H2ドメインに変異を持つL67P変異体はImp α 2及び β 1に対する結合力が共に減弱した。一方、 α H1ドメインに変異を持つ α LA変異体はImp α 2及び β 1に対し、野生型と同程度結合した。 α H1、 α H2ドメインのみを連結したキメラGFPを用いて更に検討した結果、 α H2ドメインはImp α 2及び β 1共に結合できるが、 α H1ドメインはその何れとも結合出来ないことが明らかとなった。Vprの発現ベクターをHeLa細胞に強制発現させた細胞抽出液を用いた免疫沈降法では、Vprは α H1を介して間接的にImp α 2と結合することが明らかとなった(図1)。

3) 二つの α -helixドメインの核移行における機能の解析

Vprの核移行を詳細に解析するためnuclear import assayを行った。Digitonin処理によりHeLa細胞の細胞膜に穴を開け、可溶性の因子を全て除去し、GFPとの融合蛋白として調製した種々の可溶性因子(Imp

α/β , RanGDP, P10 及び ___再生系) 存在下でインキュベートさせた。Argonレーザーで励起することによりGFPとの融合蛋白である基質蛋白の核移行の有無を検出した。また、インキュベート後の細胞を、抗Flag抗体及びCy3結合二次抗体で蛍光染色することで、核膜への局在を検出した。Vprの核移行に必要な最小領域であるN17C74および二つの α -helixドメインに点変異を導入した変異体を用いて、可溶性因子非存在下で解析した。N17C74では、核膜への局在、及び、部分的な核内移行が観察された。 α H1に点変異を導入した場合、核膜局在に変化は見られないが、核内への移行は完全に阻害された。一方、 α H2に点変異を導入した場合、核膜局在は著しく減弱したが、約30%の細胞においては、核内への移行が認められた。この結果から、二つの α -helixドメインはVprの核移行において互いに異なる機能を果たしている可能性が示唆された。

次に、二つの α -helixドメイン及びそれらの点変異体をN末端側にGST、C末端側にGFPを持つ融合蛋白として調製し、nuclear import assayを行った(図2)。 α H1では約30%の細胞において、核内への移行が観察された。しかし、核膜への局在は検出されなかった。一方、 α H2では、全ての細胞において、強い核膜局在が観察された。この結果から、可溶性因子欠損下でみられたN17C74の局在において、 α H1が核内への移行に、 α H2が核膜へのtargetingに寄与することが示された。

4) N17C74の核移行に必要な可溶性因子の解析

Digitonin処理したHeLa細胞の系を用いたnuclear import assayによって、Vprの核移行能の最小機能ドメインであるN17C74の核移行に必要な可溶性因子の検討を行った(図3)。N17C74-GFPは、バッファーのみ(因子なし)でも部分的な核移行が見られたが、大部分は核膜に局在していた。

一方、Imp α あるいは、energy 存在下では、核膜局在はほぼ消失し、核内の量が増加した。

次に、可溶性因子欠損下において N17C74-GFP を一旦、30°C 15 分インキュベートすることで核膜に結合させた後、抗 Flag 抗体及び Cy3 結合二次抗体で核膜に結合した N17C74-GFP のみを蛍光染色した。次に、エネルギーあるいは、Importin α を添加し、さらに 30°C 15 分インキュベートした (図 4)。その結果、Cy3 由来の赤色の蛍光が核内に観察されるようになった。即ち、核膜に結合した N17C74-GFP が両ファクター依存的に核内移行したことが示された。一方、可溶性因子を入れないものでは、核内に GFP 由来の緑色の蛍光しか観察されなかった。

以上の結果、Vpr の核移行の最小機能ドメインである N17C74 は単独で核膜結合しうるが、核内へと効率よく移行するためには Imp α あるいはエネルギーが必要である事が明らかとなった。

5) FG repeat を有する nucleoporin と Vpr との核膜結合の解析

核膜孔複合体には多く nucleoporin が存在し、それらの多くが FG repeat を有することが報告されている。これまでに、FG repeat を有する nucleoporin の内、POM121 と Nsp1p (ヒト p62 の酵母ホモログ) が yeast two hybrid 法により、また、Nup1p (ヒト Nup153 の酵母ホモログと予想されている)、p58 と p54 が GST-pull down assay により、FG repeat を介して Vpr と結合していることが示されている。そこで、p62、POM121 および Nup153 について、Vpr の核移行における意義を nuclear import assay によって解析した。N17C74 の核膜結合は Imp α 及び β 存在下でも影響されなかったが、p62 の存在下で著しく抑制された (図 5)。この時、Imp α あるいはエネルギー存在的な核内移行も見られなかった。同様の結果が POM121 および Nup153 の解析からも得ら

れた。

次に、 α H2 領域中に点変異 L67P を導入すると Imp α 及び β との直接結合は保持されていたが、核膜結合能は著しく低下したことから、核膜結合に Imp α との直接結合は必要ないことが示された (図 5)。

一方、 α H1 領域への点変異を導入した α LA で核膜結合並びに Imp α 及び β との直接結合は保持されていたが、Imp α との間接的な結合は消失し、さらに Imp α あるいはエネルギー依存的な核膜通過能も消失した (図 5)。

D. 考察

本研究において、我々は Vpr の核移行の機序について、1) 主として核および核膜そして一部細胞質に局在すること、2) 17-34 位 (α H1) および 46-74 位 (α H2) に存在する二つの α -helix 構造が核移行にともに必須であること、3) これらの領域はおのおの単独であっても核移行シグナルとして機能しうることを明らかにした。さらに、既に、Malim MH. および Emerman M らにより、Vpr が NLS のレセプターである Imp α 及び FG repeat を持つ nucleoporin と相互作用することを報告していたことから、GST 融合蛋白を用いた pull-down assay および Digitonin 処理 HeLa 細胞を用いた nuclear import assay を行い、Vpr の核移行におけるこれらの分子との関わりを解析した。その結果、Vpr は、4) α H2 を介して Imp α 及び FG リピートを有する nucleoporin と直接的に、さらに α H1 を介して Imp α と間接的に結合すること、5) α H2 は核膜結合に、 α H1 は核内への移行に寄与すること、6) 核膜に結合した Vpr は、Imp α あるいは Energy といった可溶性因子依存的に核膜を通過すること、7) Vpr の核膜通過には Imp α との間接結合、ならびに FG repeat を有する nucleoporin との結合のいずれもが必須であることなどを明らかにした。中でも、Imp α 依存的に核膜を通過する分子

の存在はこれまで報告がない。核移行能を持つ分子には、その核移行機序が未同定であるものも多く、新規の核移行機序として今後注目されると思われる。

本解析結果より、Vpr は極めて特徴的な核移行機序を有することが明らかとなった。特に、核膜結合とその後の核膜通過とが各々独立した反応であるという知見は、Vpr の核移行の制御を通じた PIC 核移行阻害剤開発の上で、標的作用点の多様性といった面からも特に重要である。

E. 結論

Vpr は α H2 と FG リピートを有する nucleoporin との相互作用を介して核膜に結合後、 α H1 の働きにより核内へと移行すること、その際、 α H1 介した Imp α との間接結合、及び FG repeat を有する nucleoporin を介した核膜結合が共に必須であることを明らかにした。このような Vpr による核移行は極めて特徴的であり、HIV-1 PIC の核移行を Vpr を標的にして制御できることを示唆していると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeshima S., Ikegami M., Morita M., Nakai Y. and Aida Y. Identification of new bovine BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing. *Immunogenetics*, 53:74-81, 2001.
2. Yasuda, J., Miyao, T., Kamata, M., Aida, Y. and Iwakura, Y. T cell apoptosis causes peripheral T cell depletion in mice transgenic for the HIV-1 vpr gene. *Virology*, 285: 181-192, 2001.
3. Tana, Watarai S., Aida Y., Tajima S., Kaikidani H., Onuma M. and Kodama M. Growth inhibition of cancer cells by co-transfection diphtheria toxin A-chain plasmid with bovine leukemia virus-Tax expression vector. *Microbiol. Immunol.*, 45,

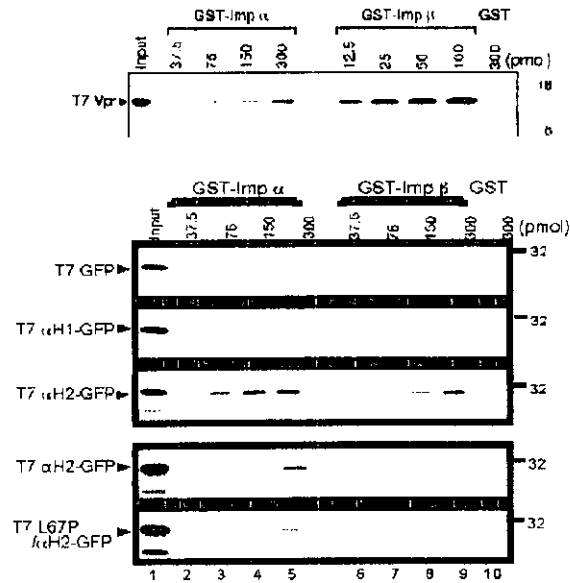
447-455, 2001.

4. Tajima S. and Aida Y. Mutant Tax proteins from bovine leukemia virus with ability to activate the expression of c-fos. *J. Virology*, in press.
 5. Takeshima S., Nakai Y., Morita M. and Aida Y. Characterization of DRB3 alleles in the MHC of Japanese Shorthorn cattle by polymerase chain reaction sequence-based typing. *J. Dairy Science.*, in press.
 6. Kamata M., and Aida Y. Induction of cell cell growth retardation by human immunodeficiency virus type 1 Vpr mediated-bystander effect. *J. Virology*, submitted.
 7. Isogai M., Aizawa S., Watanabe T. and Aida Y. Interaction between HH R23A with human immunodeficiency virus type 1 Vpr. in preparation.
 8. Kamata M., Azuma A., and Aida Y. P21^{WAF/CIP1} inhibits human immunodeficiency virus type1 Vpr-induced apoptosis. in preparation.
 9. Kamata M., Miyamoto M., Yoneda Y., and Aida Y. Importin α directly mediates the translocation through a nuclear pore of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. in preparation.
- ### 2. 学会発表
1. 飯島沙幸、ターナ、渡来仁、三輪正直、横田恭子、間陽子(2001)：“HIV-1vpr 遺伝子を用いたアポトーシス誘導ベクターの構築”、第 49 回ウイルス学会、大阪、11 月
 2. 蒲田政和、間陽子 (2001)：“HIV-1 Vpr 蛋白核移行の分子機構”、第 49 回ウイルス学会、大阪、11 月
 3. 蒲田政和、間陽子 (2001)：“Vpr の核移行に関与する核移行関与分子の解析”、第 15 回日本エイズ学会学術集会、11 月
 4. 飯島沙幸、Tana Norn、渡来仁、三輪

正直、横田恭子、問陽子(2001):”アポト
トーシスを誘導するHIV-1 vpr発現ベク
ターの解析、第15回日本エイズ学会
学術集会、11月

Vpr directly and indirectly interacts with GST-Imp α through the α H1 and α H2 domains, respectively.

A. Direct interaction



B. Indirect interaction

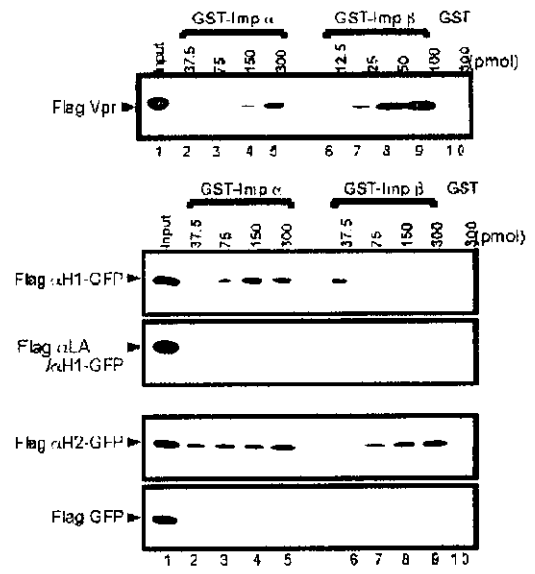


Figure 1

Two α -helical domains of Vpr have different function on the nuclear import

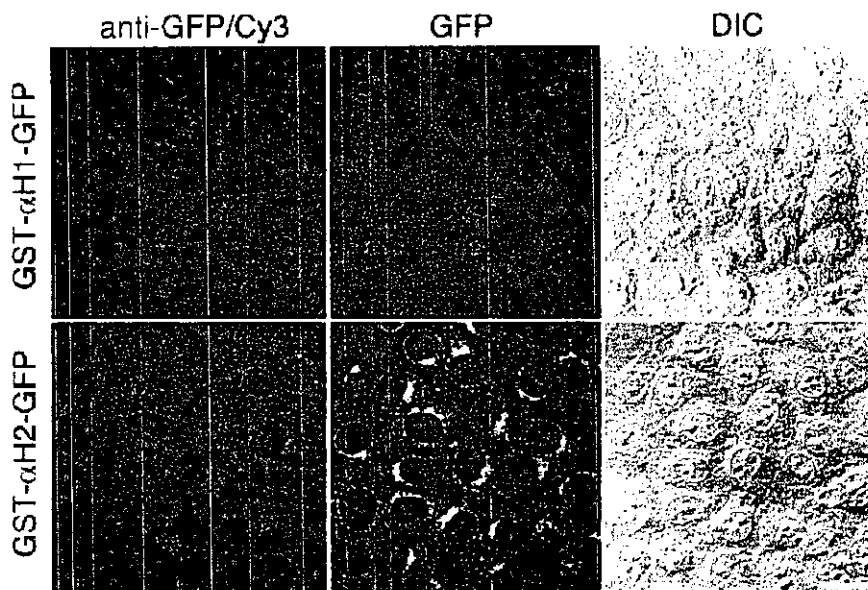


Figure 2

Promotion of nuclear-pore passage of N17C74 needs to energy and Imp α .

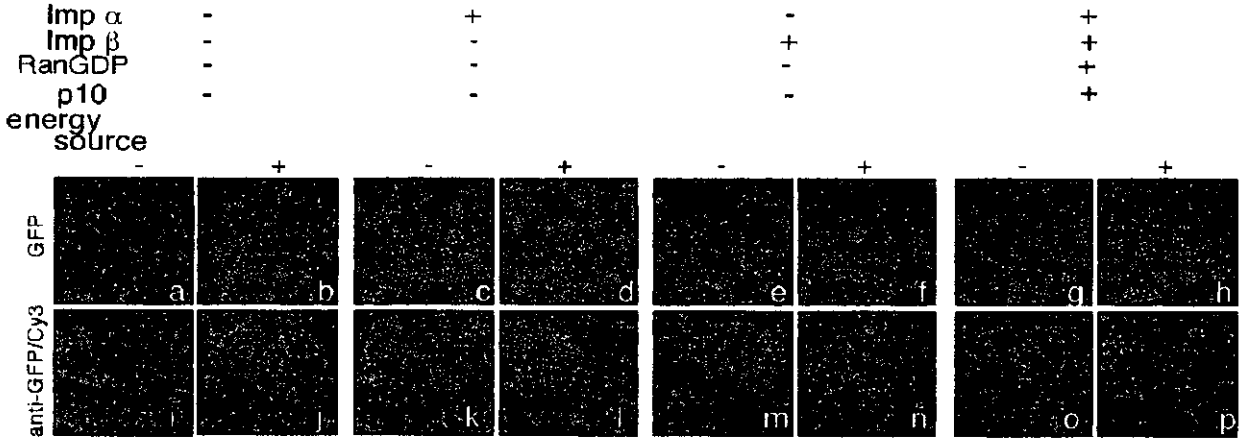


图3

Both of energy source and Imp α can promote the nuclear-pore passage of N17C74.

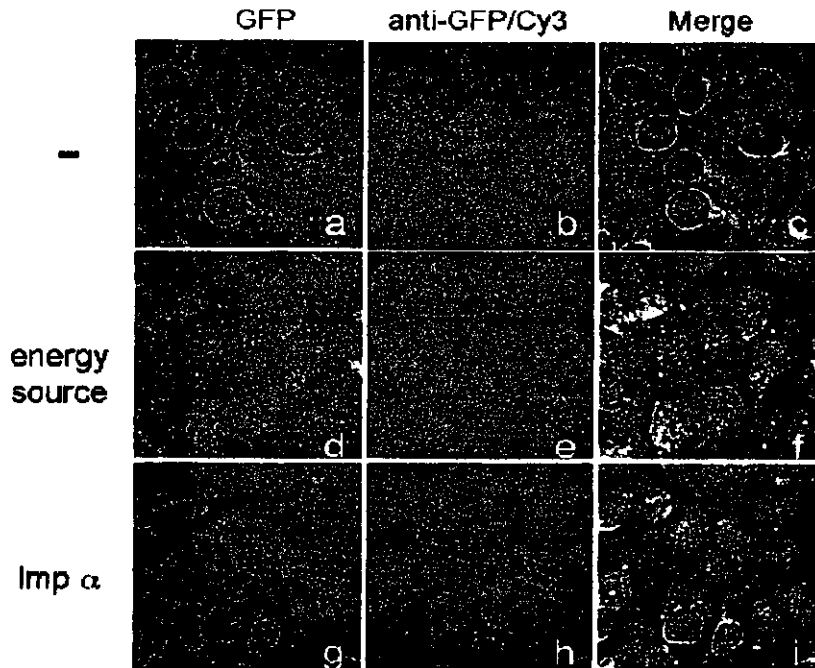


图4

Interaction with NPC and indirect interaction with importin α are both indispensable for translocation of Vpr through NPC

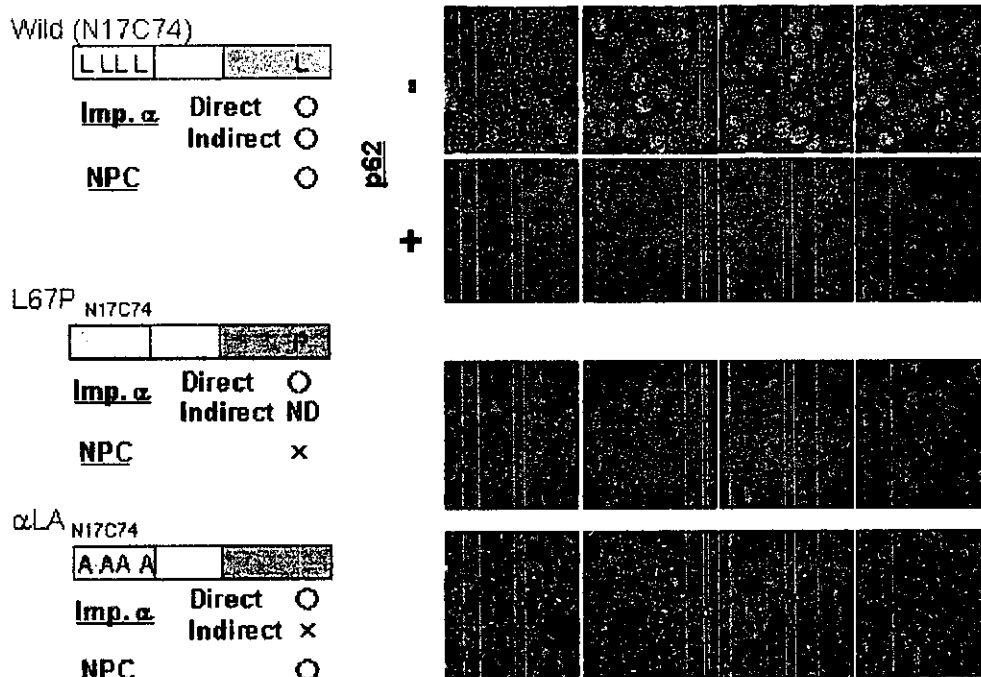


图5

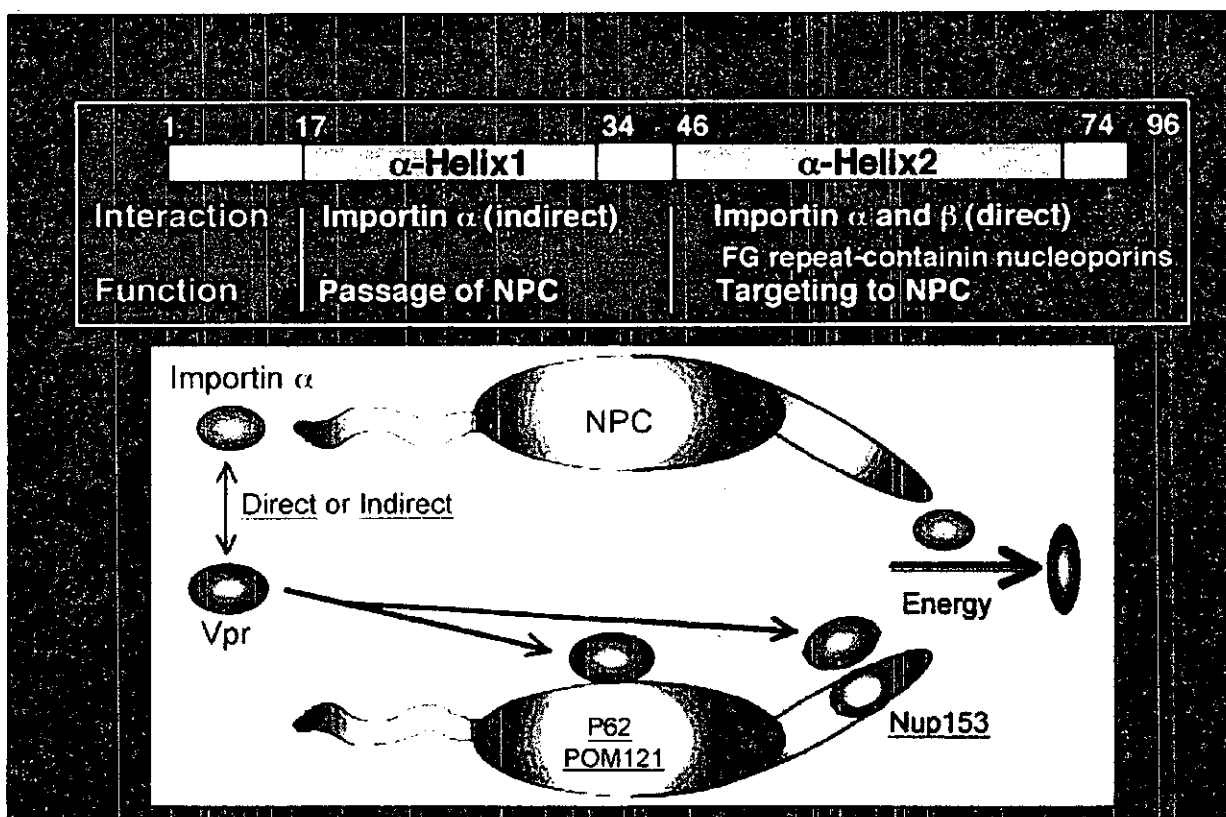


图6