

7. HIV-1 インテグラーゼの新規機能とその関連因子の探索

分担研究者 増田 貴夫 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学

研究要旨 HIV-1 インテグラーゼの核局在および核内移行能を *in vivo* 発現アッセイおよび *in vitro* 核移行アッセイにより確認した。こうした機能に關与するドメインは中央ドメイン (51-210) および、C-末端ドメイン (211-288) が重要であることが判明した。また、C-末端ドメイン (211-288) が關連細胞性因子としては、C-末端ドメイン (211-288) が importin α 2 (Rch-1) と importin β と直接あるいは間接的に結合し得る。また、transportin との結合も認めた。以上より、C-末端ドメイン (211-288) の核内移行は importin α/β を介した古典的経路の關与が示唆された。中央ドメイン (51-210) の核内移行機能には importin α/β 以外の細胞性因子の關与あるいは直接、核膜孔に結合し、エネルギー依存的に核膜孔を通過する可能性が示唆された。今後、各機能ドメインのウイルス複製における意義を検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 はマクロファージを代表とする非分裂細胞にも効率よく感染を成立し得る。この理由として HIV-1 では、ウイルスゲノムを効率良く細胞核内に輸送する能力があるためと考えられているが、詳細は不明である。昨年度、我々は HIV-1 インテグラーゼが強い核局在能を持つことを報告してきた。本研究では、インテグラーゼ蛋白の核移行機能に關与すドメインおよび細胞性因子を検討した。

B. 研究方法

1) *in vivo* 発現系: HeLa 細胞に GFP と種々のインテグラーゼ断片の融合蛋白発現ベクターを導入し、24 時間後共焦点顕微鏡により、各蛋白の細胞内局在性を検討した (図1)。

2) *in vitro* 核内輸送アッセイ: GST-GFP 発現ベクター (大阪大学、米田悦啓教授より分与) に種々のインテグラーゼ断片を挿入したリコンビナント蛋白を精製し、ディジットニン処理した HeLa 細胞に、HeLa 細胞抽出液と ATP/GTP とともに反応させ、各 GST-GFP 融合蛋白の核内移行機能を共焦点顕微鏡により検討した (図2)。

3) pull-down アッセイ: GST インテグラーゼ (全長、断片) 蛋白を HeLa 細胞抽出液と反応させ結合する細胞性因子を SDS-PAGE, Western 法により検討した

(図3)。

C. 研究結果

1) GFP-インテグラーゼ融合蛋白の核局在性には中央ドメイン (51-211) が重要である (図1)。

2) *in vitro* 核内輸送アッセイにより、インテグラーゼの核内移行能に關与するドメインとしては中央ドメイン (51-210) 及び、C-末端ドメイン (211-288) にエネルギー (ATP) および温度依存性に核内移行活性を認めた。また、N-末端ドメイン (1-50) には、核内移行活性が認められなかった (図2)。

3) インテグラーゼと importin β との間接的結合を認めた。この結合には C-末端ドメイン (212-288) の關与が示された (図3)。

D 考察

HIV-1 インテグラーゼの核局在および核内移行能を *in vivo* 発現アッセイおよび *in vitro* 核移行アッセイにより確認した。こうした機能に關与するドメインは中央ドメイン (51-210) および、C-末端ドメイン (211-288) が重要であることが判明した。また、C-末端ドメイン (211-288) が importin α/β と間接的に結合しうることより、C-末端ドメイン (211-288) の核内移行は importin β を介した古典的経路の關与が示唆された。また、中央ドメイン (51-210) の核内

移行機能には importin α/β 以外の細胞性因子の関与あるいは直接、核膜孔に結合し、エネルギー依存的に核膜孔を通過する可能性が示唆された。今後、各機能ドメインのウイルス複製における意義を検討する必要があると考えられた。

本研究結果から明かにされたインテグラーゼの新規機能ドメインは、抗 HIV 剤開発においても新たな標的分子としての可能性を示したものと考えられ、今後の展開が期待される。

E. 結論

インテグラーゼはウイルス遺伝子を染色体に組み込む酵素であるが、それ以外にもウイルス複製において、逆転写および核移行機能に関与しているものと考えられた。また、インテグラーゼ変異体によるウイルス複製抑制効果を確認した。

F. 研究発表

[論文発表]

1. Hanabuchi, S., Ohashi T., Koya Y., Kato H., Hasegawa A., Takemura T., Masuda T., and Kannagi M. Regression of HTLV-I-lymphomas by peptide-induced T-cell immunity with a newly identified Tax-epitope in rats. *J. National Cancer Institute* 93:1775-1783, 2001.
2. Ohashi T., Hanabuchi S., Kato H., Tateno H., Takemura F., Tsukahara T., Koya Y., Hasegawa A., Masuda T., and Kannagi M. Prevention of Adult T-Cell Leukemia-Like Lymphoproliferative Disease in Rats by Adoptively Transferred T Cells from a Donor Immunized with Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax-Coding DNA Vaccine. *J. Virol.* 74:9610-9616, 2000
3. Tsurutani N., Kubo M., Maeda Y., Ohashi T., Yamamoto N., Kanagi M., & Masuda T. Identification of Critical Amino Acid Residues in HIV-1 IN Required for Efficient Proviral DNA Formation at Steps Prior to Integration in Dividing and Non-dividing Cells. *J. Virol.* 74, 4795-4806, 2000.

4. Kannagi M., Ohashi T., Hanabuchi S., Kato H., Koya Y., Hasegawa A., Masuda T., and Yoshiki T. Immunological Aspects of Rat Models of HTLV Type 1-Infected T Lymphoproliferative Disease. *AIDS Research and Human Retroviruses* 16:1737-1740, 2000.

5. 増田貴夫, “インテグレーションを標的とした治療法の開発” ウイルス感染症との戦い (医薬ジャーナル社) : 390-397, 2000.

6. 増田貴夫, “HIV インテグラーゼの作用機序—宿主因子とセントラル DNA フラップ構造— *Medical Briefs in Virus Infection* 14:6-7 2001.

[学会発表]

1. 増田貴夫 “HIV-1 インテグラーゼの新たな機能：ウイルスゲノムの脱殻から組み込みまで” シンポジウム「ウイルス感染の吸着から放出まで」第 49 回日本ウイルス学会 (大阪) 2001.
2. 増田貴夫, 鶴谷直美, 庭野雪路, 周 Xin, 池田たま子, 大橋貴, 花淵志野, 山本直樹, 神奈木真理 “HIV-1 インテグラーゼ蛋白の核局在シグナルと細胞性因子の検討” 第 49 回日本ウイルス学会 (大阪) 2001.
3. 池田たま子, 周 Xin, 長谷川温彦, 大橋貴, 奈良信雄, 神奈木真理, 増田貴夫 “HIV-1 インテグラーゼ PYNP 配列の役割” 第 49 回日本ウイルス学会 (大阪) 2001.
4. Liu H., Kubo M., Ohashi T., Masuda T., Kannagi M. Allo-specific CTL from a seronegative donor suppress the replication of R5 and X4 HIV-1. 第 49 回日本ウイルス学会 (大阪) 2001
5. 大橋貴, 花淵志野, 増田貴夫, 神奈木真理 “Tax 発現 DNA ワクチン接種ラットより誘導した CTL 細胞株の HTLV-I 感染 T 細胞に対する作用の解析” 第 49 回日本ウイルス学会 (大阪) 2001.
他 2 第 49 回日本ウイルス学会 (大阪) 2001.

G. 知的所有権の出願・取得状況

無し

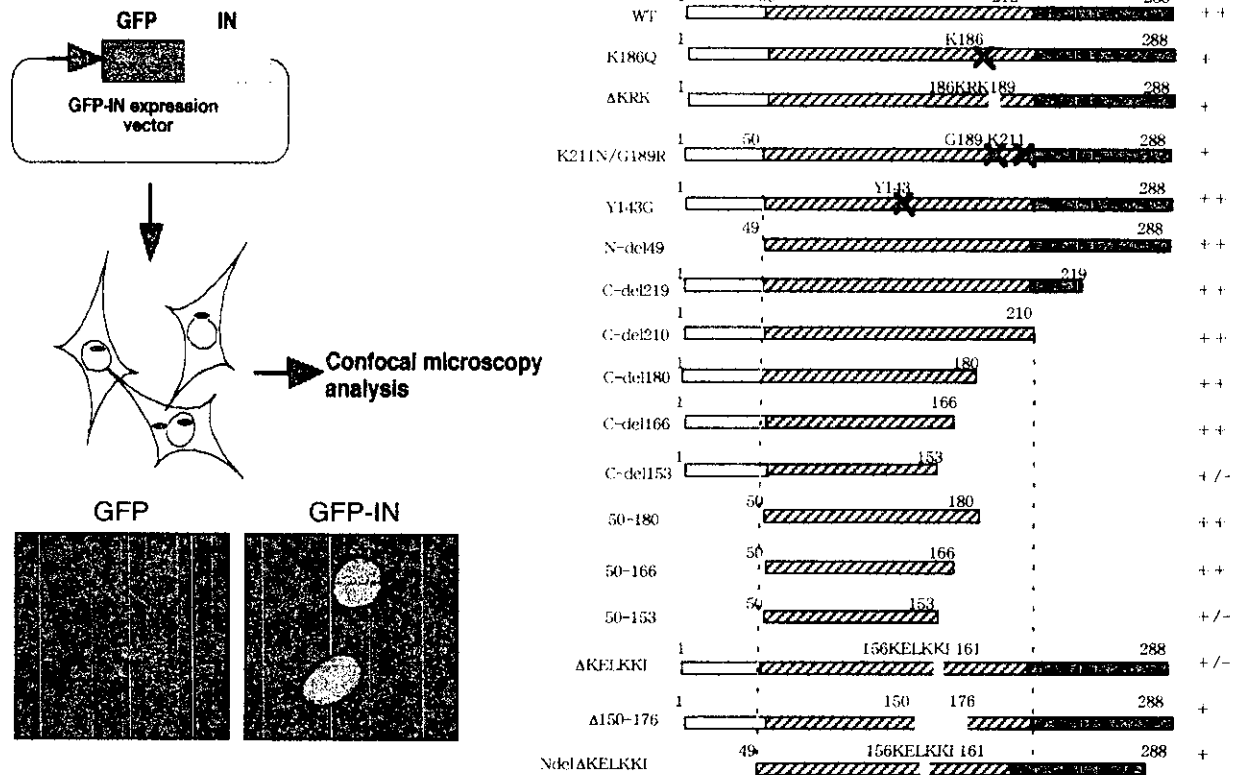


図1 *in vivo* 発現系による HIV-1 インテグラーゼの細胞内局在の検討 HeLa 細胞に GFP と種々のインテグラーゼ断片の融合蛋白発現ベクターを導入し、24 時間後共焦点顕微鏡により、各蛋白の細胞内局在性を検討した。

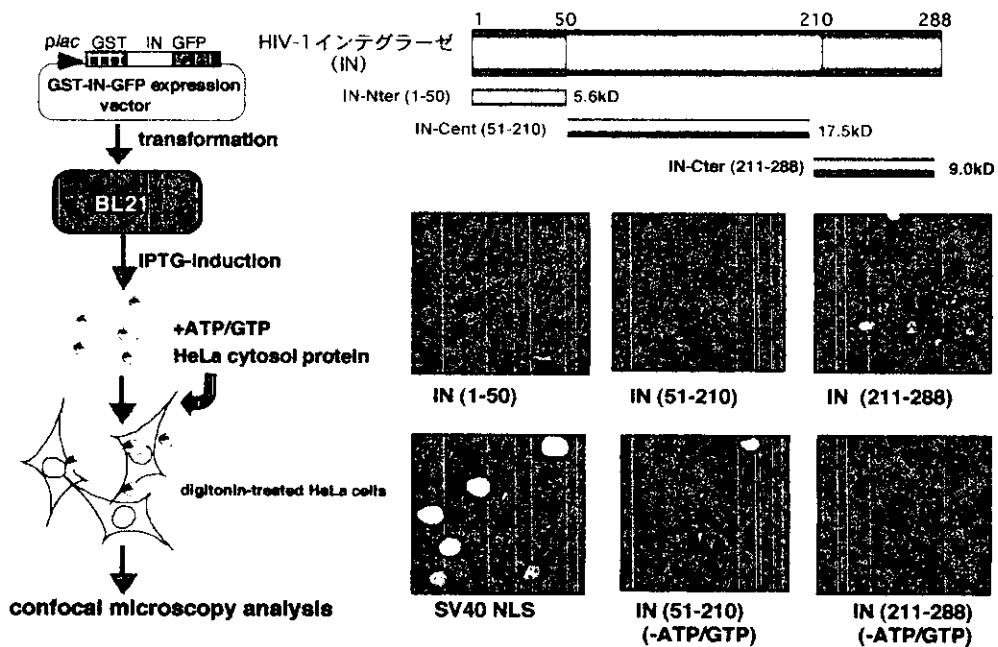
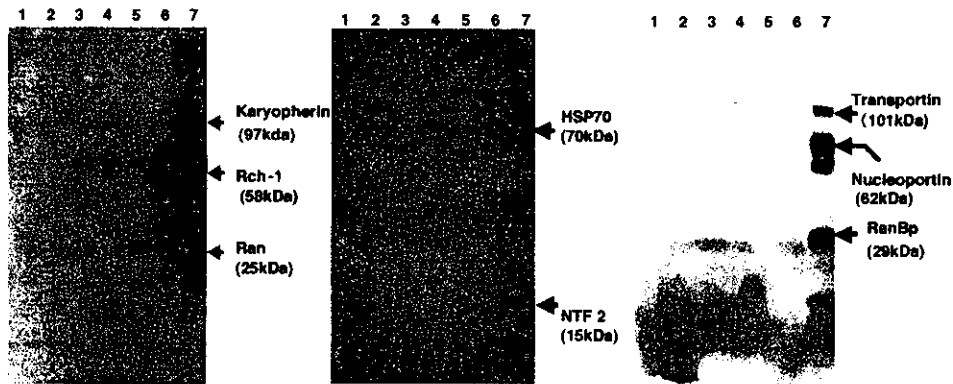


図2 *in vitro* 核内輸送アッセイによる HIV-1 インテグラーゼの細胞内局在の検討 GST-GFP 発現ベクターに種々のインテグラーゼ断片を挿入したりコンビナント蛋白を精製し、ディジトニン処理した HeLa 細胞に、HeLa 細胞抽出液と ATP/GTP とともに反応させ、各 GST-GFP 融合蛋白の核内移行機能を共焦点顕微鏡により検討した。



Lanes 1:GST, 2:GST-IN₁₋₅₅, 3:GST-IN₅₁₋₂₁₀ 4:GST-IN₂₁₁₋₂₈₈,
 5:GST-IN_{full} 6:GST-NLS_{SV40}, 7:HeLa cell lysate

図3 pull-down アッセイによる HIV-1 インテグラーゼ各ドメインと結合する核内輸送因子の検討
 GSTインテグラーゼ(全長、断片)蛋白をHeLa細胞抽出液と反応させ結合する細胞性因子をSDS-PAGE, Western
 法により検討した。

8. IFN- γ による HIV-1 複製抑制効果と statin 化合物の作用

分担研究者 岡本 尚 名古屋市立大学医学部分子医学研究所分子遺伝

研究要旨 IFN γ が HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス増殖を抑えることが以前より指摘されている。我々は Tat と class II transactivator (CIITA)が共通の因子 cyclin T1(P-TEFb)を要求し、これらの転写活性化が相互に抑制しあうことを報告してきた。今回我々は、IFN γ の抗 HIV 作用が JAK-STAT 経路の活性化に伴う CIITA 誘導による Tat の HIV-1 トランス活性化能の抑制と HIV-1 複製の抑制を引き起こすことを明らかにした。一方、HAART 療法でのウイルス・プロテアーゼ阻害剤使用に伴う dyslipidemia の治療に使用される simvastatin 等の statin 系化合物が CIITA 誘導を抑えることが欧米のグループにより報告されている。そこで、我々は simvastatin が IFN γ の抗 HIV 作用に干渉することによって結果的に HIV-1 複製を促進する可能性を危惧して一連の実験を行ったが、少なくとも単球や T 細胞株ではそのような作用は見いだされなかった。

A. 研究目的

HIV がコードする転写活性化因子 Tat は、ウイルスの爆発的な複製を可能にしている。Tat の転写伸長促進作用には cyclin T1 と CDK9 を含む複合体からなる P-TEFb が必須である。他方、AIDS とならんで重症免疫不全を起こす疾患として bare lymphocyte syndrome (BLS) と呼ばれる先天性免疫不全症候群があるが、BLS は MHC クラス II(MHC II)遺伝子の転写制御因子である class II transactivator (CIITA) の遺伝子レベルの変異で起こる遺伝性疾患である。BLS では MHC II 遺伝子転写の活性化に必要な不可欠な転写活性化因子 CIITA に遺伝子変異が起こっており MHC II の発現誘導ができず、そのため抗原提示細胞 APC 機能が障害され重症型の免疫不全症候群を呈する。さらに、 γ インターフェロンによる MHC II の発現誘導には CIITA によることが示されている。AIDS においては HIV の APC への感染が Tat による CIITA の機能障害を引き起こし、その結果 BLS と同様に APC による抗原認識レベルでも免疫不全を引き起こしていることを昨年度報告した(Immunity 12:61-70, 2000)。また逆に、CIITA の発現が Tat の機能を抑え HIV の増殖を抑えることも報告した(BBRC 279:494-499,2000)。以上より、 γ -IFN などによる CIITA の誘導が AIDS の病態進行を抑える可能性が示唆されたので以下の実験を行なった。

B. 研究方法

(1) 薬および抗体：組換えヒト IFN γ と TNF α は市販のものを用いた。Simvastatin は和光純薬、抗 STAT1 と抗 Cyclin T1 抗体およびリン酸化型 STAT1 に対する抗体はそれぞれ Santa Cruz 社および Cell Signaling Technology 社より購入した。

(2) 細胞株およびウイルス：HIV-1 潜伏感染細胞株である OM10.1 以外に HL60, Jurkat, THP1 および Tat を構成的に産生する THP1/Tat 細胞株(Merlin et al. FEBS Lett. 394:9-13,1996)を用いた。HIV-1 full-length proviral DNA を含むプラスミッドとしては pNL4-3 を用いた。細胞からのウイルス産生量は、培養細胞上清中のウイルス p24 抗原量を p24 antigen capture ELISA assay (RetroTek 社)により定量した。

(3) 細胞表面 MHC II 抗原の測定：細胞表面での MHC II (HLA-DR, HLA-DP)の発現は FACS によって解析した。

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

(5) ウェスタンブロット法：細胞抽出液の作成およびウェスタンブロット法は既に報告した方法(Oncogene 18:5177-5186; J. Biol. Chem. 275:4383-4390,2000)に拠った。

C. 研究成果

まず IFN γ による HIV-1 潜伏感染細胞 OM10.1 からのウイルス産生に対する効果を検定した。OM10.1 細胞に TNF α 刺激を加えることにより著しいウイルス産生の誘導が起こった。しかしながら、種々の濃度の IFN γ であらかじめ細胞を処理することにより TNF α によるウイルス産生が濃度依存性に低下した(Fig. 1)。

また、STAT1 およびその活性化型であるリン酸化された STAT1 をウエスタンブロット法により見たところ、IFN γ 刺激5分後より STAT1 の活性化が認められ、しかも IFN γ の濃度に依存していた(Fig. 2)。他方、cyclin T1 の量には変化が見られなかった。

さらに、IFN γ による CIITA 誘導は CIITA に対する良い抗体がないため MHC II の発現をモニターした。ヒト単球系細胞株 THP-1 に IFN γ を作用させたところ MHC II の発現は約 15 倍に増加したことから CIITA 活性の誘導が確認された(Fig. 3)。

次に、これらの IFN γ の効果が Tat 作用を抑制するためによって起こっているかを見るために HIV-1 LTR をプロモーターに持つ luciferase reporter プラスミッドからの遺伝子発現の Tat によるトランス活性化に対する IFN γ の効果を検定した。HL60 および Jurkat いずれの細胞株においても、IFN γ による Tat のトランス活性化に対する著明な抑制作用が確認された(Fig. 4)。

Kwak ら (Swiss Med. Wkly 131:41-46, 2001) および Sadeghi ら (Transplantation 71: 1262- 1268, 2001) により少なくとも血管内皮細胞では HMG CoA reductase 阻害剤である statin 系化合物が CIITA の誘導を障害することを報告している。そこで、まず IFN γ 処理に伴う STAT1 活性化と MHC II 誘導に対する simvastatin の効果を検定したが、種々の濃度の simvastatin による効果は認められなかった(Figs. 5, 6)。同様に OM10.1 において simvastatin の効果を検定した。上記の実験と同様 IFN γ 投与による TNF α 刺激に伴うウイルス産生誘導の抑制に対して、simvastatin は最大 5 μ M 投与しても作用を認めなかった(Fig. 7)。

D. 考 察

今回の一連の実験から、IFN γ による HIV 複製抑制作用が Tat のウイルス遺伝子発現トランス活性化作用の抑制によることが明らかになった。このことは IFN γ もしくはその inducer が HIV-1 感染者に対して発症予防の作用をするであろうことを強く示唆した。他方、simvastatin による IFN γ 作用の抑制効果は少なくとも HIV の自然宿主である T 細胞株や単球系細胞株では見られなかった。このことより、HAART 療法に伴ってしばしば出現する dyslipidemia の治療に対する statin 系化合物の使用によってウイルス複製を促進する可能性は否定的である。しかしながら、これらの実験結果はいずれも培養細胞を用いての結果に過ぎないため、今後以上の可能性を考慮に入れて臨床観察を行う必要がある。

以前に報告した結果とあわせて考えると、ウイルス増殖と免疫不全の病態進行には Tat が重要な作用をしているとともに、CIITA の過剰発現もしくは活性誘導によりこれらの病態の逆行が可能であることが示された。実際に、HIV-1 感染者の血清中の γ IFN の濃度とウイルス負荷量が逆相関し、長期未発症例では γ IFN 濃度の高い患者が多い(Bailer et al., J. Immunol. 162: 7534-7542, 1999)ことからこれらの可能性が裏付けられる。

E. 結 論

IFN γ は Tat 作用を抑制することによって抗 HIV 作用を示す。また、Tat による APC 抑制効果は抗原提示細胞での抗原提示に関わる MHC II 遺伝子の免疫応答に伴う発現誘導を阻止する事によって先天性の重症免疫不全症のひとつである bare lymphocyte syndrome (BLS)と同様の状態を引き起こすことが明らかにされているが、IFN γ やその inducer などにより CIITA の活性化を促進することにより HIV 感染に伴う AIDS の発症を遅らせる、もしくは病態を逆行させて治療に向かわせることが可能なことが、今回の研究結果から理論的に示唆された。

F. 研究発表 (論文発表)

1) Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Shimizu, M., Itoh, M. and

Okamoto, T. : Involvement of the pro-oncoprotein TLS (Translocated in liposarcoma) in nuclear factor- κ B p65-mediated transcription as a coactivator. *J. Biol. Chem.* 276: 13395-13401, 2001.

2) Senoo, M., Tsuchiya, I., Matsumura, Y., Mori, T., Saito, Y., Kato, H., Okamoto, T. and Habu, S. : Transcriptional dysregulation of the p73L / p63 / p51 / p40 / KET gene in human squamous cell carcinomas : expression of Δ Np73L, a novel dominant-negative isoform, and loss of expression of the potential tumour suppressor p51. *Br. J. Cancer* 84:1235-1241, 2001.

3) Ando, T., Kawabe, T., Ohara, H., Ducommun, B., Itoh, M. and Okamoto, T. : Involvement of interaction between p21 and PCNA for the maintenance of G2/M arrest after DNA damage. *J. Biol. Chem.* 276:42971-42977, 2001.

4) Matsumoto, S., Imaeda, Y., Umemoto, S., Kobayashi, K., and Okamoto, T. : Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br. J. Cancer*, 2002 (in press).

5) Kawabe, T., Suganuma, M., Ando, T., Kimura, M., Hori, H. and Okamoto, T. : Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene* (in press) 2002

6) Maki, M., Matsukawa, N., Yuasa, H., Otsuka, Y., Yamamoto, T., Akatsu, H., Okamoto, T., Ueda, R., Ojika, K. : Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in Alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002 (in press)

7) Sarol, L.C., Imai, K., Asamitsu, K., Tetsuka, T., Barzaga, N.G. and Okamoto, T. : Inhibitory effects of IFN- γ on HIV-1 replication in latently infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002 (in press)

G. 知的所有権の取得状況

なし

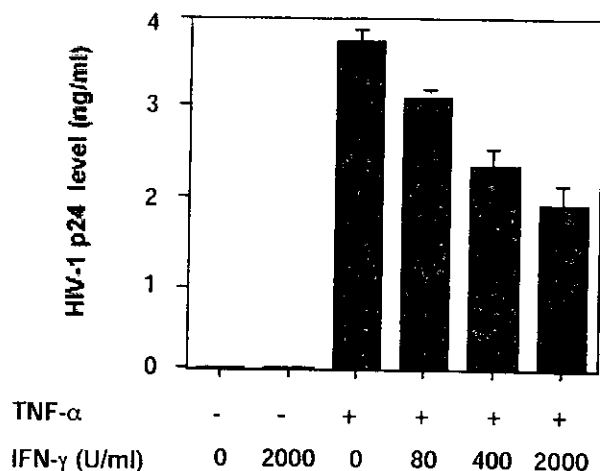


Fig. 1 Effect of IFN- γ on HIV replication from the latently infected OM10.1 cells.

OM10.1 cells were treated with various concentrations of IFN- γ (80 – 2000 U/ml) for 3 hr, stimulated with TNF- α (1.0 ng/ml), and further incubated for additional 24 hr. The culture supernatant was determined for the viral p24 antigen level (ng/ml),

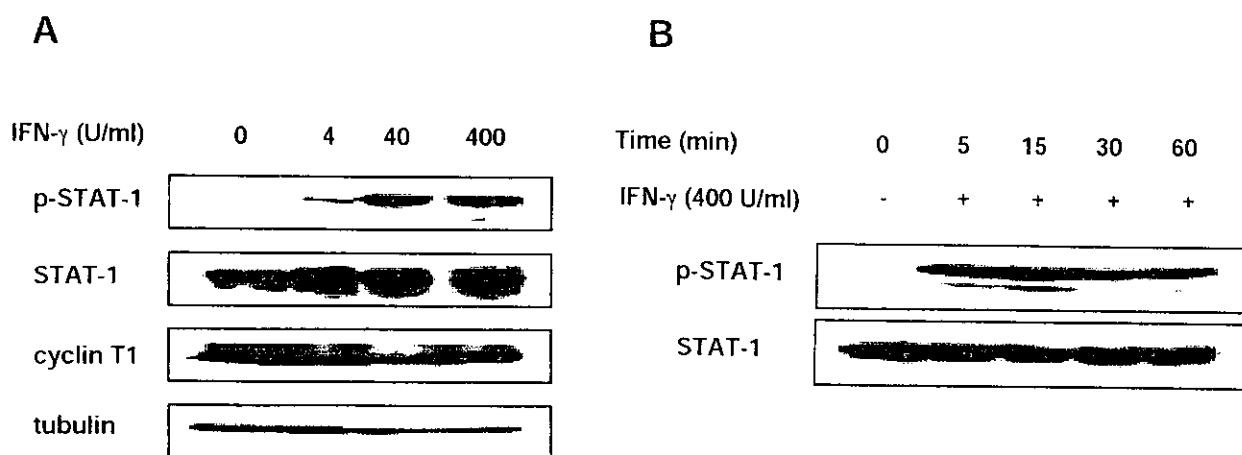


Fig. 2 Activation of JAK-STAT pathway by IFN- γ . (A) Western blot detection of the phosphorylated form of STAT-1. OM10.1 cells were stimulated with IFN- γ (400 U/ml) for the indicated time and the whole cell lysate was tested for the amount of STAT-1 and its phosphorylated form (p-STAT-1).

(B) Dose-dependent induction of STAT-1 phosphorylation by IFN- γ .

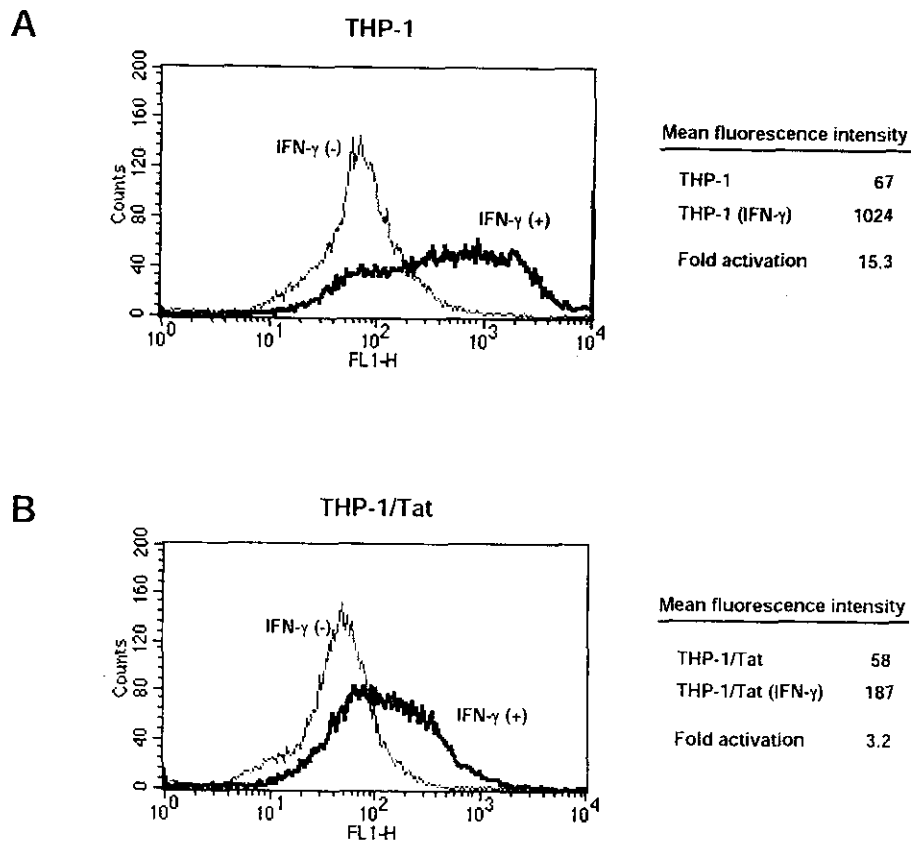


Fig. 3 Induction of MHC II by IFN- γ and the effect of Tat. THP-1 (A) and THP-1/Tat (B) cells stably expressing HIV-1 Tat protein were first stimulated with PMA (10 ng/ml) for 24 hr, in order to induce IFN- γ receptor, before treatment with IFN- γ (400 U/ml) for another 24 hr. The cell surface expression of MHC II antigens (HLA-DP,DQ and DR) was measured by flow cytometry using a specific antibody. The mean fluorescence intensity value for each culture and the extent of induction are indicated. Thick line, with IFN- γ (400 U/ml); Thin line, without IFN- γ .

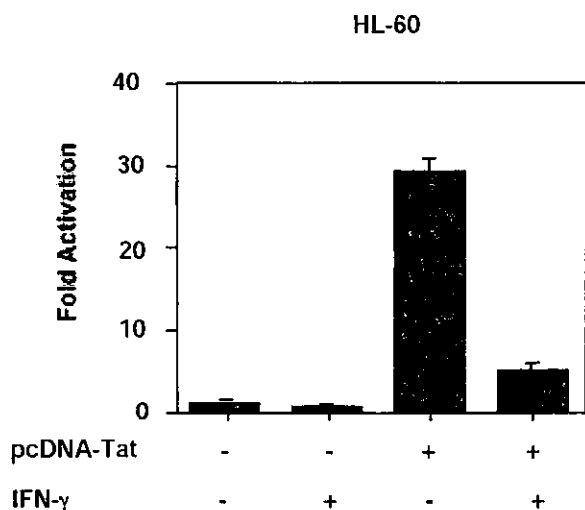
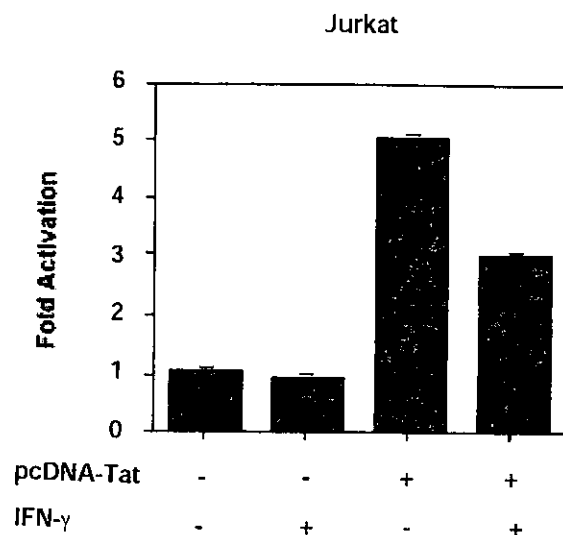
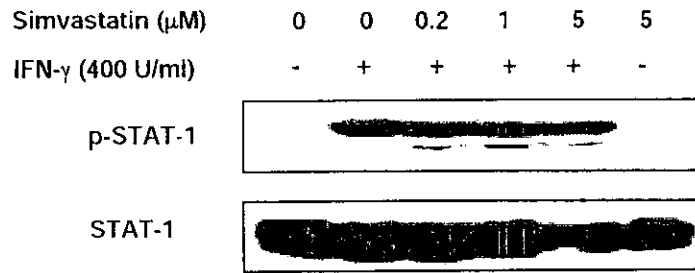
A**B**

Fig. 4 Effect of IFN- γ on Tat-mediated transactivation. HL-60 (A) and Jurkat (B) cells were transfected with CD12-luc, a luciferase reporter plasmid under the control of HIV-1 LTR, and pcDNA-Tat, expressing Tat, for 24 hr and stimulated with IFN- γ and incubated for another 24 hr. The whole cell lysate was prepared from each transfectant and determined for the luciferase activity as described. Experiments were performed in triplicates and the results were represented by the mean value and the standard deviation. Similar experiments were carried out for each cell line at least three times and the representative data are shown.

A



B

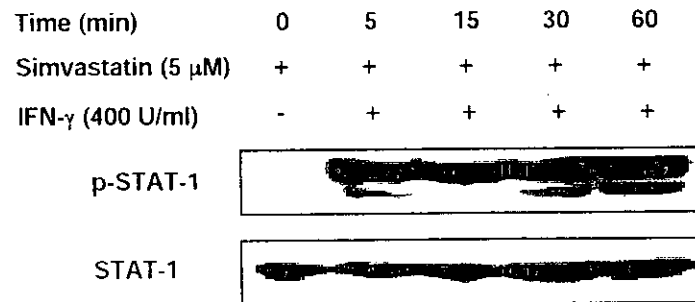


Fig. 5 Effect of simvastatin on the JAK-STAT signaling. (A) Western blot detection of the level of STAT-1 and its phosphorylated form (p-STAT-1) induced by IFN- γ in the presence of various concentrations of simvastatin. (B) Effect of simvastatin on the time course of the appearance of the STAT-1 activated form (p-STAT-1). These data indicate that simvastatin did not alter the JAK-STAT pathway induced by IFN- γ .

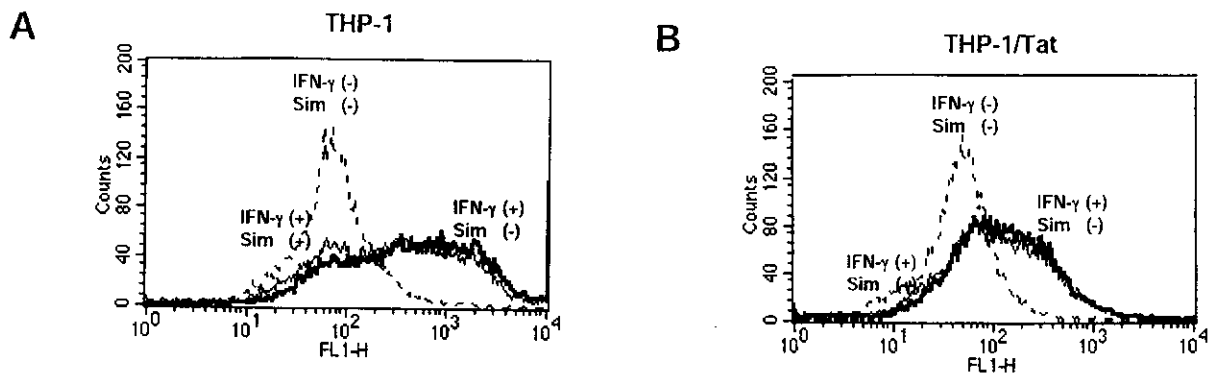


Fig. 6 Effect of simvastatin on MHC II induction by IFN- γ . Experiments were similarly performed as in Fig. 3. THP-1 (A) and THP-1/Tat (B) cells were treated with 5 μ M simvastatin for 3 hr and stimulated with IFN- γ (400 U/ml) for another 24 hr. The cell surface expression of MHC II antigens measured by flow cytometry.

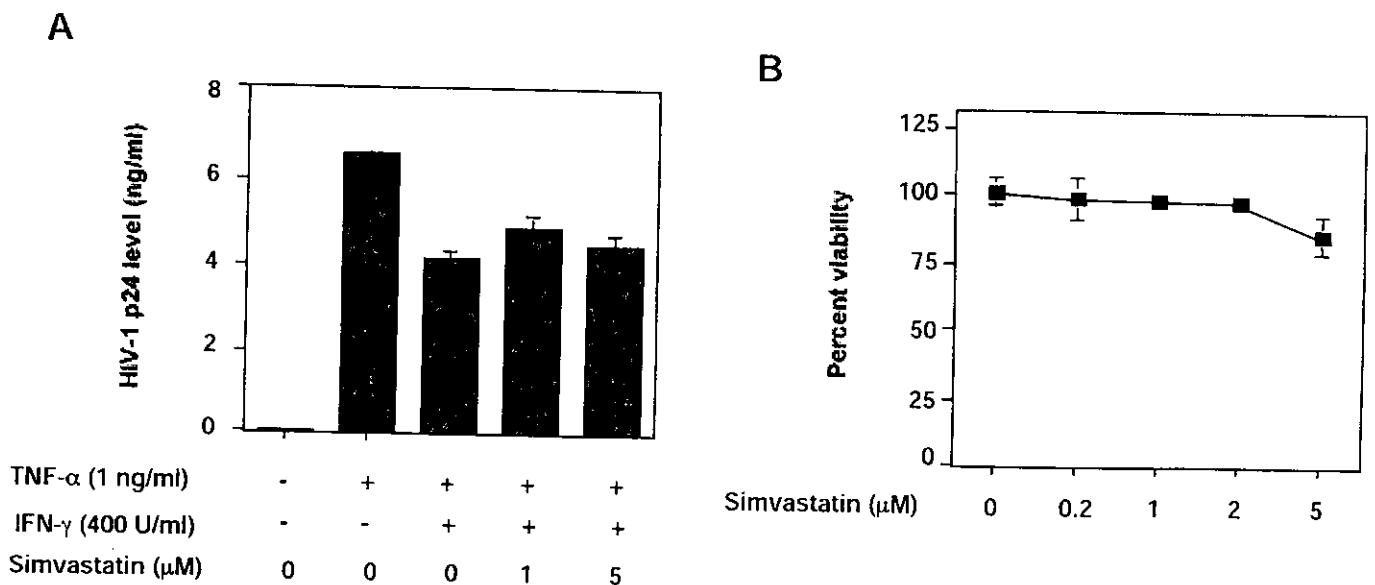


Fig. 7 (A) Lack of effect of simvastatin on the suppression of HIV-1 replication by IFN- γ in the latently infected OM10.1 cells. Cells were successively treated with various amounts of simvastatin for 3 hr, IFN- γ (400 U/ml) for 3 hr, stimulated with TNF- α for 24 hr and harvested for the determination of the viral p24 level in the culture supernatant. (B) Cytotoxicity of simvastatin.

9. SIV Env の成熟と機能発現における糖鎖の役割

分担研究者： 佐藤 裕徳

共同研究者： 富田 康浩

(研究要旨) 一連の SIV Env Gp120 糖鎖欠損変異体について、Env と小胞体分子シャペロン (カルネキシン及びカルレティキュリン) との相互作用の動態、Env 前駆体 Gp160 の開裂反応の動態、細胞膜への輸送、および細胞膜に発現した Env の膜融合活性を解析した。その結果、カルレティキュリンとの相互作用活性の維持に必要な糖鎖付加部位 (N295 と N316)、Gp160 前駆体開裂反応感受性の維持に必要な糖鎖付加部位 (N284)、立体構造の維持に必要な糖鎖付加部位 (N284 と N295) が同定された。しかし、これらの変異体は全て細胞表面まで輸送され、細胞融合活性を保持していた。これらの結果は、(i) SIV Env Gp120 C2 領域の糖鎖は、小胞体およびゴルジ体における Env の高次構造形成に重要な役割を果たす、(ii) SIV Env Gp120 は、一般的な膜タンパク質と異なり、糖鎖の欠失に寛容で細胞内のタンパク質品質管理機構に低感受性であることを示唆する。

A. 研究目的

レンチウイルスの Env Gp120 には、20-40 個もの多数の糖鎖が付加している。これらの糖鎖は、宿主免疫系からの逃避に重要な役割を果たすと考えられている。一方、一般に、膜タンパク質の糖鎖は、タンパク質の高次構造形成、品質管理、細胞内輸送、タンパク質間相互作用などに重要な役割を果たすことが知られている。レンチウイルス Env Gp120 においても、タンパク質の成熟と機能発現に関与する糖鎖が存在すると推察されるが、この点は現在全く不明である。

HIV-1 の 2 つの株 (NL43 と HXB2) の Gp120 について、高度に保存されている糖鎖付加部位の変異体を用い、個々の糖鎖の欠失がウイルスの感染性に与える影響が調べられている。これらの解析により、感染性保持に必須の 1~5 箇所の糖鎖付加部位が同定されている。また、SIVmac239 Gp120 について同様の解析がなされ、感染性保持に必須の 4 箇所の糖鎖付加部位が報告されている。これらの糖鎖の欠失は、Env

の成熟過程に異常をきたすことにより、Gp120 機能の減退・消失を招いている可能性がある。

本研究では、HIV/SIV で進化上高度に保存されている糖鎖が Env の細胞内成熟と機能発現に果たす役割について理解を深めることを目的とした。

B. 研究方法

個々の糖鎖を欠失させた一連の SIV Env 糖鎖欠損変異体および種々の抗体を用い、Env 新規合成初期から膜輸送に至る細胞内成熟過程について以下の解析を行った。

(1) SIV 分子クローン

SIVmac239 野生株及び糖鎖欠失変異株のプロウイルス DNA 全長を含むプラスミド DNA (Ogimoto, et al. J. Virol.72:8365-8370, 1998) は、永井美之教授 (富山県衛生研究所) および塩田達雄教授 (大阪大学微生物病研究所) より分与を受けた。

(2) 抗体

抗カルネキシン (calnexin, CNX) 抗体及び抗

カルレティキュリン (calreticulin, CRT) 抗体 (Tomita, et al., J. Biochem. 126, 1090-1100, 1999) は、平秀晴教授 (岩手大学農学部) より分与を受けた。

SIV 感染サル血漿は、森一泰博士 (国立感染症研究所エイズ研究センター) より分与を受けた。SIVmac251 Gp120 N 末端のリニア-エピトープを認識する抗体 (251L) およびコンフォメーションナルエピトープを認識する抗体 (251C) は Advanced Biotechnologies INC より購入した。

(3) 細胞

MAGIC-5A 細胞 (Hachiya, et al., Antimicrob. Agents Chemother. 45: 495 - 501, 2001) は、巽正志博士 (国立感染症研究所獣医科学部) より分与を受けた。

(4) SIV Env と小胞体分子シャペロンとの相互作用の動態解析

HeLa 細胞に SIVmac239 野生株または糖鎖欠失変異体プラスミド DNA をフュージン (ロッシュ) を用いて導入し、³⁵S-Met/Cys でパルスラベル/チェイス後、細胞抽出液を抗 CNX 抗体または、抗 CRT 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降物は、8% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離した。

(5) SIV Env プロセッシングの動態解析

HeLa 細胞に SIVmac239 野生株または糖鎖欠失変異体プラスミド DNA を導入し、³⁵S-Met/Cys でパルスラベル/チェイス後、細胞抽出液を SIVmac239 野生型感染サル由来の血漿を用いて免疫沈降し、免疫沈降物を SDS 化した後、8% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離した。

(6) SIV Env の細胞表面発現の検出

HeLa 細胞に SIVmac239 野生株または糖鎖欠失変異体プラスミド DNA を導入し、細胞をメタノール不含のパラホルムアルデヒドで固定した後、251L および 251C を用いて間接蛍光

抗体法により細胞表面の Env を染色した。

(7) SIV Env の膜融合活性の解析

MAGIC-5A 細胞に SIVmac239 野生株または糖鎖欠失変異体プラスミド DNA を導入し、2 日後に X-gal による染色を行い、巨核細胞の検出を行った。

C. 研究結果

(1) SIV Env と小胞体分子シャペロンとの相互作用の動態 (図 1 及び図 2)

1. 抗 CNX 抗体を用いた共沈降実験の結果、野生型及び全ての糖鎖欠失変異体がカルネキシンと同じカイネテイクスで相互作用することが示された。

2. 抗 CRT 抗体を用いた共沈降実験の結果、SIVmac239 野生型、N278Q 及び N284Q 変異体はカルレティキュリンと同じカイネテイクスで相互作用することが示された。一方、N295Q 及び N316Q 変異体はカルレティキュリンと相互作用しないことが示された。

(2) SIV Env プロセッシングの動態 (図 3)

N278Q, N295Q, N316Q 変異体 gp160 は、新規合成後 180 分の時点で 80% 以上が Gp120 に開裂されていることが示された。一方、N284Q 変異体 gp160 は、野生型に比べ開裂効率が有為に低下していることが示された。この結果から、N284Q 変異体の糖鎖の欠損は、gp160 の高次構造変化を引き起こし、エンドプロテアーゼによる開裂感受性を低下させると推察された。

(3) SIV Env の細胞表面発現 (図 4)

SIV Gp120 のリニア-エピトープを認識する抗体 (251L) を用いた間接蛍光抗体法により、野生型及び全ての糖鎖欠失変異体で蛍光が確認された。この結果から全ての糖鎖欠失変異体は、細胞表面まで発現していることが示された。

一方、コンフォメーションナルエピトープを認識する抗体 (251C) を用いた時は、野生型、

N278Q 及び N316Q 変異体で蛍光が確認されたが、N284Q 及び N295Q 変異体では、蛍光が確認されなかった。この結果から、細胞表面に発現している N284Q 及び N295Q 変異体は、野生型とは異なる高次構造を形成していることが示された。

(4) SIV Env の膜融合活性 (図 5)

野生型及び全ての糖鎖欠失変異体 Env は、MAGIC5A 細胞で巨核細胞の形成を誘導した。この結果から、全ての糖鎖欠失変異体は、発現細胞表面において細胞融合能を保持していることが示された。

D. 考察

本研究により、レンチウイルスで初めて Env の小胞体分子シャペロンとの相互作用に関与する糖鎖が同定された (図 1、2)。また、SIV Env Gp120 に付加する多数の糖鎖のうち、C2 領域の糖鎖が、細胞内における Env の高次構造形成に重要な役割を果たすことを示唆した (図 1-3、4B)。

Los Alamos HIV sequence database に登録されているレンチウイルス Gp120 分離株配列を検索したところ、C2 領域の糖鎖付加部位は、SIVmac, SIVsm, SIVagm, SIVcpz, HIV-1, HIV-2 において高度に保存されていることが判明した。進化上保存度の高い C2 領域の糖鎖付加部位は、Gp120 の機能発現およびウイルスの感染性保持に重要な働きをしていることが推察される。

C2 領域は疎水性が高く、Gp120 高次構造形成の過程でタンパク質内部に折り畳まれる可能性が高い。したがって、この領域の糖鎖の有無は、Gp120 の立体構造に大きな影響をもたらす、結果として Gp120 の機能変化に結びつく可能性が高い。実際、本研究において、C2 領域の少なくとも 3 箇所の糖鎖 (N284, N295 と N316) が欠損すると Gp120 の立体構造形成過程に異

常が生じることが示された (図 1-3、4B)。

通常、細胞内成熟過程で異常をきたしたタンパク質は、細胞内分解系で分解される。一般に、分子量の大きい糖鎖の欠失は、細胞内品質管理機構に検知され分解される可能性が高い。しかし、予想に反して、全ての糖鎖欠失 Env 変異体は、細胞表面まで輸送され、さらに膜融合活性を保持していた (図 4A、5)。この結果は、SIV Env Gp120 は、一般的な膜タンパク質と異なり、糖鎖の欠失に寛容で細胞内のタンパク質品質管理機構に低感受性であることを示唆する。

この特徴は、HIV-1 Gp120 でも保持されている可能性が高い。個々の糖鎖を欠失した場合、感染性が消失するのは 1 箇所のみ (SIV では N278 に相当) である。感染性が維持されている変異体においても、糖鎖の欠失は Gp120 の高次構造形成に影響すると考えられる。したがって、HIV-1 Gp120 も SIV Gp120 同様、糖鎖の欠失に寛容で細胞内のタンパク質品質管理機構に低感受性である可能性が高い。レンチウイルス Gp120 糖鎖変異体がどのようなしくみで細胞内のタンパク質品質管理機構を効率的に逃避するのかは今後の課題として残されている。

SIVmac239 では、C2 領域の 4 箇所の糖鎖 (N278, N284, N295, N316) は感染性保持に必須であることが示されている。今回、これら全ての糖鎖欠損変異 Env は細胞膜まで輸送され、膜融合能を保持していた。したがって、現時点で、糖鎖欠損による感染性消失の分子機構は不明である。今後、Env の集合とウイルスへの取り込み効率、ウイルス粒子の Gp120/gp41 複合体の安定性、CD4 やケモカインレセプターとの相互作用能などを解析することにより、糖鎖欠損による感染性消失の分子機構を明らかにしたい。

E. 結論

一連の SIV Env Gp120 糖鎖欠損変異体を用

い、(i) カルレティキュリンとの相互作用活性の維持に必要な糖鎖付加部位 (N295 と N316)、(ii) gp160 前駆体開裂反応感受性の維持に必要な糖鎖付加部位 (N284)、(iii) 立体構造の維持に必要な糖鎖付加部位 (N284 と N295) を同定した(図 6)。また、SIV Gp120 は、一般的な膜タンパク質と異なり、糖鎖の欠失に寛容で細胞内のタンパク質品質管理機構に低感受性であることを示唆した。

F. 研究発表

(1) 発表論文

1. Sato H, Tomita Y, Ebisawa K, Hachiya A, Shibamura K, Shiino T, Yang R, Tatsumi M, Gushi K, Umeyama H, Oka S, Takebe Y, and Nagai Y. Augmentation of HIV-1 subtype E (CRF01_AE) multiple-drug resistance by insertion of a foreign 11-amino-acid fragment into the reverse transcriptase. *J. Virol.* 75:5604-5613, 2001.
2. Kato K., Kusagawa S, Motomura K, Yang R, Shiino T, Nohtomi K, Sato H, Shibamura K, Hien NT, Chi PK, Thang PH, Thanh DC, Quoc NC, Thang BD, Long HT, Nagai Y, and Takebe Y. Closely Related HIV-1 CRF01_AE Variant among Injecting Drug Users in Northern Vietnam: Evidence of HIV Spread across the Vietnam-China Border. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 17:113-123, 2001.
3. Kusagawa S, Sato H, Tomita Y, Masashi T, Kato K, Motomura K, Yang R, Takebe Y: Isolation and characterization of replication-competent molecular DNA clones of HIV type 1 CRF01_AE with different coreceptor usages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 18 : 115-122, 2002.
4. Fukuda K, Tomiyama H, Wasi C, Matsuda T, Kusagawa S, Sato H, Oka S, Takebe Y, and Takiguchi M. Cytotoxic T cell recognition of HIV-1 cross-clade and clade-specific epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese. *AIDS* 2002 (in press).

(2) 口頭発表

1. 佐藤裕徳. HIV-1 逆転写酵素の分子進化：外来製 1 アミノ酸挿入変異による多剤耐性形質の獲得. 第 4 回白馬シンポジウム、7 月 27 日、2001 年、東京.
2. Sato H. An HIV-1 reverse transcriptase mutant possessing insertion of a foreign 11-amino-acid fragment in the enzyme active center. Symposium on the Global Search for an AIDS Vaccine. Sponsored by International AIDS Vaccine Initiative (IAVI) and Japanese Foundation for AIDS Prevention. 15 Nov. 2001, Tokyo.
3. 佐藤裕徳. HIV-1 薬剤耐性と逆転写酵素の分子進化. 第 15 回日本エイズ学会学術集会、シンポジウム 6 『薬剤耐性 (基礎)』 11 月 30 日、2001 年、東京.
4. Sato H, Tomita Y, Ebisawa K, Hachiya A, Oka A, Umeyama H, Takebe Y, and Nagai Y. Evolution of HIV-1 reverse transcriptase by insertion of an 11-amino-acid fragment in the enzyme active center. Keystone Symposia, Colorado, USA. 5-11 January, 2002.
5. Sato H. Human immunodeficiency virus and mutation. 第 3 回阪大微研国際感染症フォーラム. 23 Jan. 2002, Osaka.

G. 知的所有権の取得状況

特許取得 なし
 実用新案登録 なし
 その他 なし

The interaction of SIVmac239 Env glycosylation mutants with Calnexin (CNX) and Calreticulin (CRT)

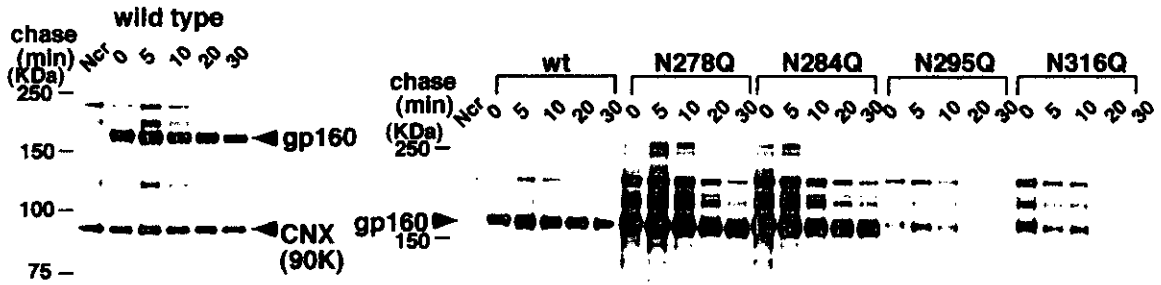


图1

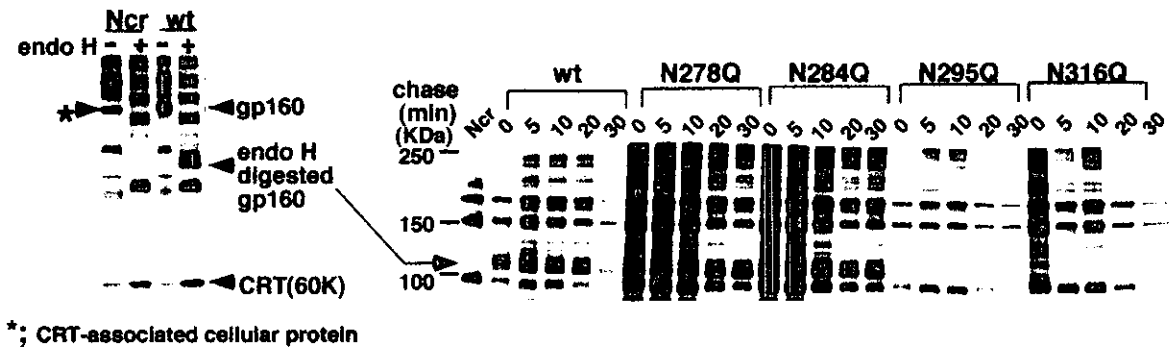


图2

Cleavage of SIVmac239 Env glycosylation mutants gp160 to gp120

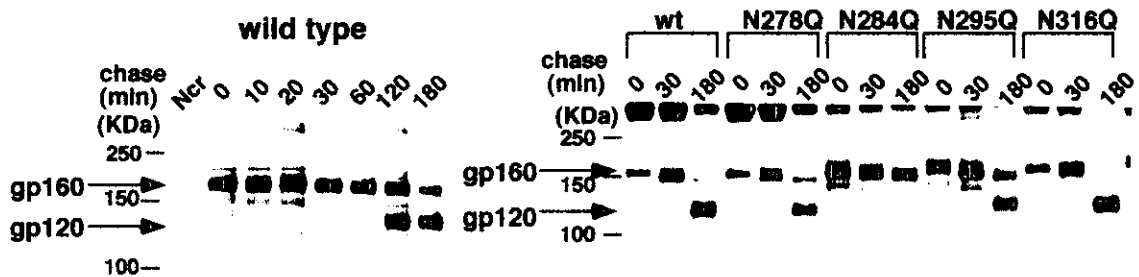
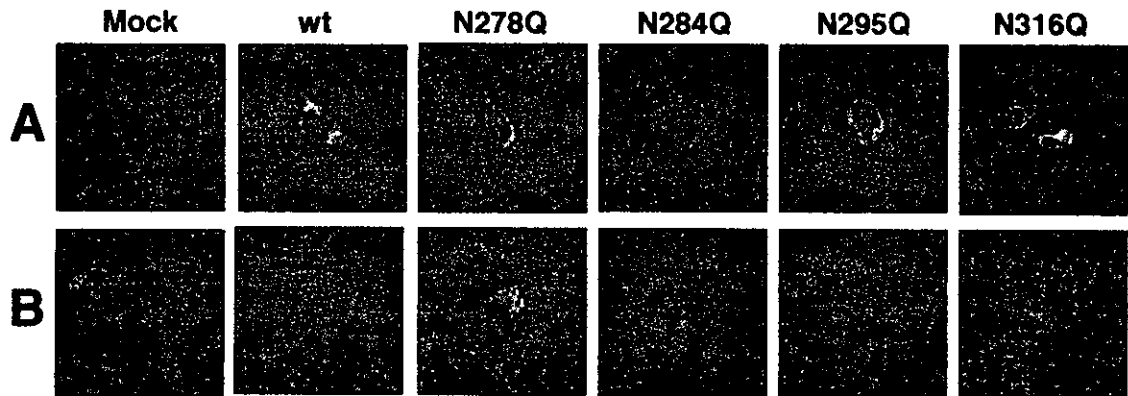


图3

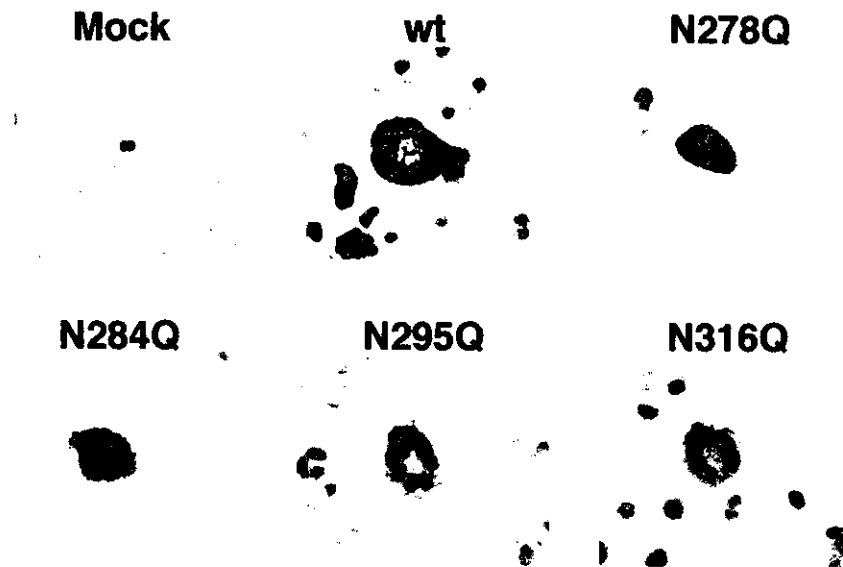
Cell surface expression of SIVmac239 gp120 glycosylation mutants



A: anti-SIVmac251 gp120-1 (recognizing linear epitope)
B: anti-SIVmac251 gp120-2 (recognizing conformational epitope)

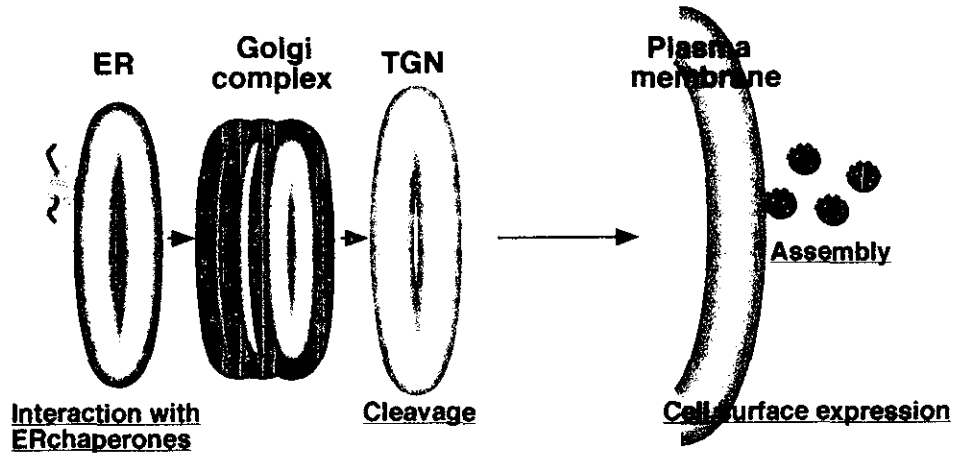
☒4

Fusion competency of SIVmac239 Env glycosylation mutants on MAGIC-5 cells



☒5

Summary



	Infectivity	Chaperone interaction:		Cleavage	Cell surface expression (FA)		Fusion
		calnexin	calreticulin		SIVmac251-1	SIVmac251-2	
Wild type	+	+	+	+	+	+	+
N278Q	-	+	+	+	+	+	+
N284Q	-	+	+	partial	+	-	+
N295Q	-	+	-	+	+	-	+
N316Q	-	+	-	+	+	+	+

6

10. 厚生労働省科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)

分担 研究報告書

HIV-1 発芽機構に関与するウイルス及び宿主因子

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 HIV-1 の発芽粒子にはゲノム RNA、gag 蛋白、宿主 nucleolin が複合体を形成し取り込まれていることが判明した。この複合体形成は発芽自体をエンハンスすることも解った。さらにエントリー後の複製機構にどのように影響していくかさらに解析が必要である。

A. 研究目的

HIV-1 粒子の発芽を制御する機構を解明することを目的とした。ウイルス因子と結合する宿主因子を中心に解析を進めた。マウスレトロウイルスでは宿主 nucleolin が gag 蛋白と C 末で結合しており、さらに nucleolin は RNA 結合蛋白であることも報告されていることから、HIV-1 の粒子発芽において gag 蛋白、nucleolin、ゲノム RNA の複合的な関係を調べた。

B. 研究方法

1. RK (ウサギ腎臓) 細胞に組替えワクシニアウイルスによって、gag 蛋白を発現させた。また同時にパッケージングシグナルを有する RNA またはない RNA を転写するプラスミドをトランスフェクションにより導入した。さらに組替えアデノウイルスにより nucleolin を発現させた。
2. 上清中のウイルス量を超遠心により集め、ウエスタンブロットによって比較した。
3. Infectious clone DNA をトランス

フェクションすることで粒子を発現させ、2 と同様の比較を行った。Nucleolin はプラスミドのトランスフェクションによって発現させた。

4. HeLa (ヒト) 細胞を使用し 1,2 と同様の比較を行った。
5. シュークローズ密度勾配によって上精中の粒子を分離し、RNA および nucleolin の取り込みを調べた。
6. パッケージングシグナルの有無による nucleolin の粒子中への取り込みをシュークローズ密度勾配により調べた。
7. Gag 蛋白と nucleolin の結合を免疫沈降によって調べた。

C. 研究成果

1. Nucleolin 及びパッケージングシグナルを有する RNA は粒子の発芽効率を上昇させた。
2. Infectious clone DNA を使用し gag 以外の蛋白の発現があっても同様に nucleolin 及びパッケージングシグナルを有する RNA は粒子の発芽効率を上昇させた。