

3. ヒト由来細胞の HeLa 細胞によっても同様のことを確認した。
4. 発現させた RNA および nucleolin は粒子中に取り込まれていることが判明した。
5. パッケージングシグナルの無い RNA の場合、nucleolin の粒子への取り込みは極端に低下することが判明した。
6. Nucleolin は gag 蛋白と細胞内において結合していることが判明した。

D. 考察

Nucleolin はゲノム RNA のパッケージングシグナルに結合することは既に報告されているが、今回さらに、gag 蛋白と nucleolin の結合を証明することができた。ゲノム RNA のパッケージングシグナル、gag 蛋白および nucleolin は複合体として粒子中へ取り込まれていると考えられた。

Nucleolin の粒子中への取り込みはパッケージングシグナルの有無によって制御されている。複合体形成は粒子発芽をエンハンスしてもいる。複合体形成は発芽に必須な構造であると考えられた。さらに複合体は、ウイルス粒子のエントリー後の複製に nucleolin が関与している可能性も示唆している。

HIV-1 の粒子発芽においてはユビキチンライゲースとそのサプレッサー因子群の関与が最近報告されている。Nucleolin はサプレッサーである tom1 とホモロジーがあり、ユビキチンがはたらく機構をもとに発芽をエンハンス

している可能性がある。ユビキチン系との関係も解析が必要である。

E. 結論

宿主 nucleolin は gag と RNA に結合し、複合体を形成し粒子内へ取り込まれる。この複合体形成が粒子の発芽を直接促進することが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hasegawa H, Kadowaki S, Aizawa H, Takahashi H, Iwasaki T, Tamura S, Kurata T, Sata T. Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. Vaccine 2002 in press.

Okada Y, Endo S, Takahashi H, Sawa H, Umemura T, Nagashima K.

Distribution and function of JC virus agnoprotein. J. NeuroVirol, 7:302-306, 2001

2. 学会発表

高橋秀宗、倉田毅、佐多徹太郎
HIV-1 ゲノム RNA の安定性に関する研究 第 49 回日本ウイルス学会総会 2001

庄谷裕子、上野智規、徳永研三、高橋秀宗、倉田毅、佐多徹太郎
サル細胞を用いた HIV-1 複製機構の解析 第 49 回日本ウイルス学会総会 2001

HIV-1 発芽機構に関与するウイルス及び宿主因子 上野智規、徳永研三、千葉丈、佐多徹太郎、高橋秀宗第 15 回日本エイズ学会

G. 知的所有権の取得状況 なし

11. HIV-1 Vpr による宿主細胞周期の攪乱に関与する宿主因子に関する研究

分担研究者 増田 道明 獨協医科大学医学部・教授

研究要旨 HIV-1 Vpr は宿主細胞周期の G₂/M arrest を誘導することにより、ウイルス複製に促進的に作用すると考えられている。また、Vpr は下等真核生物である分裂酵母においても G₂/M arrest を誘導し、それには宿主因子 Wee1 が関与する。本研究では、*wee1* 欠損分裂酵母の Vpr 感受性が、ヒト WEE1 を発現させることにより、回復することが示された。また、Vpr 感受性の賦与には、ヒト WEE1 のキナーゼ活性や、C末のセリン残基リン酸化による安定化が必要であることが示唆された。これらの知見は、抗 Vpr 薬開発の分子基盤となる可能性がある。

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 HIV-1 の複製に対して促進的に働くと考えられている。分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) モデル系を用いた以前の研究から、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)。また、Vpr による分裂酵母の G₂/M arrest には Wee1 発現量の増加を伴うという予備知見を得ている。本研究は、これらの知見を自然宿主における現象に敷衍するため、ヒト WEE1 およびその変異体を *wee1* 遺伝子欠損分裂酵母で発現させ、Vpr 感受性への影響を解析しようとするものである。

B. 研究方法

ヒト WEE1 cDNA (東京大学・岡山博士より分与) を分裂酵母用発現ベクター pAUR224 にクローニングし、pAUR-WEE1 を構築した。WEE1 の C 末に GFP で標識した融合蛋白を発現する pAUR-WEE1-GFP も同様に構築した。さらに、WEE1 の Lys³²⁸ を Arg に、あるいは Ser⁶⁴² を Ala に置換した変異体 K328R や S642A と GFP の融合蛋白を発現するベクターも構築した。あらかじめ 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) を導入した *wee1* 遺伝子欠損分裂酵母にこれらのベクターを導入し、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た。抗 WEE1 抗体や抗 GFP 抗体を用いたウェスタン法により WEE1 やその変異体の発現を検討した。

C. 研究成果

wee1 遺伝子を欠損した分裂酵母にコントロールベクター pAUR224 を導入したものは Vpr を発現しても *cdc* phenotype を示さず、G₂/M arrest は見られなかった (図 1A)。一方、pAUR-WEE1 を導入すると、Vpr による G₂/M arrest 誘導に対する感受性が回復した (図 1A)。抗 WEE1 抗体を用いて分裂酵母におけるヒト WEE1 の発現を解析したところ、本来の分子量 (98 kDa) よりも小さいことがわかった (図 1B)。他の実験データと合わせて考えると、N 末側が truncate した形で発現しているものと思われる。また、Vpr の発現条件下では、WEE1 の発現量が増加していた (図 1B)。pAUR-WEE1-GFP を導入した場合も Vpr 感受性は回復し、GFP 標識は WEE1 の機能に影響を与えなかった。一方、WEE1 の K328R 変異体や S642A 変異体を発現させた場合は、Vpr

感受性の明らかな回復は見られなかった。

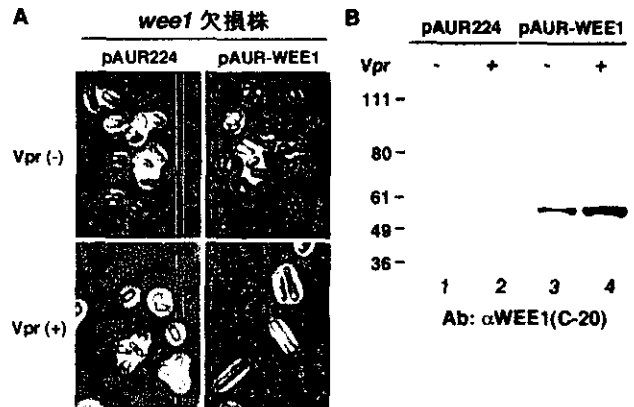


図 1. (A) *wee1* 遺伝子を欠損する酵母は Vpr 感受性を失うが、ヒト WEE1 遺伝子の導入により Vpr 感受性が回復し、*cdc* phenotype を呈する。(B) Vpr の発現に伴い、分裂酵母におけるヒト WEE1 の発現量は増加した。分裂酵母で発現させたヒト WEE1 は本来の分子量 (98 kDa; 上の矢印) より小さく (下の矢印)、他の実験結果より、N 末が truncate した形で発現している可能性が示された。また、Vpr の発現に伴い、WEE1 の発現量は増加した。

D. 考察

分裂酵母はヒトの細胞周期制御機構の研究モデルとして有用性が知られている。ヒト WEE1 が分裂酵母に Vpr 感受性を賦与するという今回の知見は、ヒト細胞の Vpr 感受性にも WEE1 が関与する可能性を強く示唆する。WEE1 蛋白の N 末側には、WEE1 の機能を負に制御する領域があると言われており、分裂酵母ではこの部分が truncate した形で発現しているようである。WEE1 の Lys³²⁸ が Vpr 感受性に重要であることから、Vpr による G₂/M arrest には WEE1 のキナーゼ活性が必須であると思われる。また、Ser⁶⁴² の重要性も示された。Ser⁶⁴² のリン酸化が WEE1 の分解抑制を司るという報告もあり、Vpr が WEE1 蛋白の安定化を介して G₂/M arrest を誘導している可能性がある。Vpr 発現下で、WEE1 の増加が認められたのも、この可能性と合致する。

E. 結論

分裂酵母は Vpr による G₂/M arrest 誘導に関与する宿主因子の解析において有用なモデル系であることが今回の研究からも示された。今後は、Vpr の作用機序に関与する可能性のある WEE1 以外のヒトの宿主因子 (14-3-3 蛋白など) についても分裂酵母を用いた解析を行う予定である。また、アデノウイルスベクター等による Vpr 発現系を用いて、ヒト培養細胞において Vpr

が宿主因子に与える影響も解析し、Vpr による G₂M arrest の誘導メカニズムの解明を目指すつもりである。そこから得られる成果は Vpr を標的とした抗 HIV 療法の開発につながることも期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ishii, T., Matsuse, T., Igarashi, H., Masuda, M., Teramoto, S., and Ouchi, Y. Tobacco smoke reduces viability in human lung fibroblasts: protective effect of glutathione S-transferase P1. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 280:L1189-L1195, 2001.

2. 学会発表

(1) Jin, Y., Nomoto, A., and Masuda, M. Infidelity in MuLV integrase-mediated DNA processing revealed by the SLIP method and its possible implication. 日本レトロウイルス研究会第 4 回夏期セミナー，豊橋，平成 13 年 8 月。

(2) 増田 道明. HIV-1 mucosal immunity 成立のためのワクチン開発に向けて. 日本レトロウイルス研究会第 4 回夏期セミナー，豊橋，平成 13 年 8 月。

(3) Masuda, M., Wilt, S. G., Hoffman, P. M., Ruscetti, S. K., and Masuda, M. Studies on the effects of ecotropic MuLV infection on expression of its receptor, using GFP-tagged mCAT1. 13th International Workshop on Retroviral Pathogenesis, Lugano, Switzerland, October 2001.

(4) Jinno-Oue, A., Dugger, N. V., Wilt, S. G., Hoffman, P. M., Masuda, M., and Ruscetti, S. K. Expression of inducible nitric oxide synthase and elevation of tyrosine nitration of a 32 kDa cellular protein in brain capillary endothelial cells from rats infected with neuropathogenic murine leukemia virus. 日本ウイルス学会第 49 回学術集会，大阪，平成 13 年 11 月。

(5) 増田 道明. PVC-211 マウスレトロウイルスによる神経変性の誘導機構に関する研究. 日本ウイルス学会第 49 回学術集会，大阪，平成 13 年 11 月。

12. HIV アクセサリー蛋白質の機能解析

分担研究者 足立昭夫（徳島大学医学部ウイルス学教室）

研究要旨 HIVの複製機構および病原性発現機序の解明のため、アクセサリー蛋白質の系統的、網羅的解析を行なった。本年度の主な成果は以下のごとくである。HIV-1 アクセサリー蛋白質の個体レベルの感染実験系の確立を目指して SIVmac gag 遺伝子（capsid 領域）の一部を持つ種々のハイブリッド HIV-1（HSIV）を構築した。これらには感染性のあるウイルスが多数含まれており、SIVmac の表現型を示すクローンもあった。自然宿主細胞ではウイルス複製に必須であるアクセサリー蛋白質 Vif の系統的変異体解析を行なった。システイン領域や親水性領域は HIV-1 の複製能に極めて重要であることが明らかになった。T 細胞中での機能が不明である HIV-2 Vpx/Vpr について欠損体解析をおこなった。Vpx はウイルスゲノムの核移行に、Vpr はウイルス蛋白質合成後の複製後期過程に参与していることが示された。

A. 研究目的

HIV には他のレトロウイルスには存在しない 5 種類のアクセサリー蛋白質（Vif、Vpx、Vpr、Vpu、Nef）があり、ウイルス複製や病原性発現に重要な役割を果たしている。しかし、アクセサリー蛋白質は特定の細胞でしか働かないこと、また、様々な生物活性があること、などからその作用機構の全体像は全く不明である。HIV アクセサリー蛋白質の機能解明には、新たな実験システムの構築と詳細かつ系統的な変異体解析が必要不可欠である。本研究では、これらを研究課題として網羅的な実験解析を行なう（図 1）。

B. 研究方法

HIV の感染性分子クローン pNL432（HIV-1）および pGL-AN（HIV-2）から遺伝子工学的手法により一連の変異体、組換え体、マーカークローンなどを作製した。それぞれのクローンにつきトランスフェクションや感染実験を行ない、感染性、DNA 合成能、蛋白質合成能、粒子産生能などを MAGI アッセイ、CAT アッセイ、PCR、ウエスタンブロッティング、ELISA などで解析した。

C. 研究結果

1. 感染性 HSIV の構築。図 2 に示したように、pNL432 を基にして 16 種の HSIV を作製した。MAGI や M8166 細胞を標的細

胞にして調べたところ、少なくとも 12 種に感染性が認められた。クローン CS86/93 は SIVmac と同様サイクロフィリン A 非依存性に増殖した。

2. HIV-1 Vif の機能。システイン領域や中央部の親水性領域に着目して 31 種の変異体を作製し、その複製能を検討した。システイン領域の変異体ではわずかなアミノ酸の違いで細胞によるウイルス複製能に大きな差が認められた (図 3)。親水性領域の 88 と 89 番のアミノ酸は Vif 機能に必須であるが、必ずしもある特定の アミノ酸である必要はなかった (表 1)。
3. HIV-2 Vpx/Vpr の T 細胞中での機能。我々の樹立したサル T 細胞株 HSC-F で Vpx/Vpr 欠損体の複製欠損部位を同定した。得られた結果より、Vpx はウイルスゲノムの核移行を制御していることが明らかになった。Vpx 欠損体と同様の複製欠損を示す点変異体も多数あった (図 4)。Vpr 欠損体は Vpx との 2 重欠損体の時のみ複製欠損が認められた。この時の欠損部位は転写・翻訳以降でウイルス粒子集合・放出過程にあった。
4. HIV-1 Nef と CTL。熊本大の滝口教授らとの共同研究で、Nef は MHC-I を介した抗原提示を抑制することにより CTL からの感染細胞の認識を回避することを示した (論文投稿中)。
5. HIV-1 Vpu とアポトーシス。米国 NIH の明里博士らとの共同研究で、Vpu が Vpr と同レベルのアポトーシス誘導能を持つことを示した (論文 2)。

D. 考察

本年度の研究で HIV アクセサリー蛋白質

の機能解明のためのシステムの構築が大きく前進した。これに加え、HIV-2 Vpx の T 細胞での機能や Vpr の新たな役割も示すことができた。さらに、HIV-1 Vif の機能に必須のアミノ酸も同定された。共同研究も順調に進み、HIV-1 Nef と Vpu の極めて重要な機能が明らかにされた。

E. 結論

HIV アクセサリー蛋白質は HIV にユニークであり HIV の生物学的特性を担っている。研究目的の項で述べたようにアクセサリー蛋白質の本態解明には系統的で網羅的な解析が必須であり、また、新しい実験システムの構築も必要とされる。アクセサリー蛋白質は細胞レベルおよび個体レベルでの HIV 複製機構の理解とエイズ発症機序の解明に非常に重要であるので、本研究ではこの方針に沿った取り組みを展開する。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Isaka, Y., Miki, S., Kawauchi, S., Suyama, A., Sugimoto, H., **Adachi, A.**, Miura, T., Hayami, M., Yoshie, O., Fujiwara, T., and Sato, A. 2001. A single amino acid change at Leu-188 in the reverse transcriptase of HIV-2 and SIV renders them sensitive to non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Archives of Virology* 146: 743-755.
- (2) Akari, H., Bour, S., Kao S., **Adachi, A.**, and Strebel, K. 2001. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by

suppressing the nuclear factor κ B-dependent expression of anti-apoptotic factors. *Journal of Experimental Medicine* 194: 1299-1312.

- (3) Fujita, M., Yoshida, A., Miyaura, M., Sakurai, A., Akari, H., Koyama, A.H., and **Adachi, A.** 2001. Cyclophilin A-independent replication of a human immunodeficiency virus type 1 isolate carrying a small portion of the simian immunodeficiency virus SIV_{MAC} gag capsid region. *Journal of Virology* 75: 10527-10531.
- (4) Fujita, M., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakai K., and **Adachi, A.** 2001. Analysis of the cell-dependent replication potentials of human immunodeficiency virus type 1 *vif* mutants. *Microbes and Infection* 3: 1093-1099.
- (5) **Adachi, A.**, Miyaura, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Koyama, A.H., and Fujita, M. 2001. Growth characteristics of SHIV without the *vpu* gene. *International Journal of Molecular Medicine* 8: 641-644.
- (6) 足立昭夫. 2001. AIDS のウイルス学. *組織培養工学* 27:294-297.
- (7) 足立昭夫. 2001. 抗 HIV 療法の現状. *四国医学雑誌* 57:160-165.
- (8) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Matsumoto, S., Miyaura, M., and **Adachi, A.** Subtle mutations in the cysteine region of HIV-1 Vif drastically alter the viral replication phenotype. *Microbes and Infection*, in press.
- (9) 足立昭夫. HIV とその遺伝子機能. ヒトレトロウイルス研究の最前線 (シュプリンガーフェアラーク社) 印刷中.

2. 学会発表

- (1) 富山宏子、明里宏文、足立昭夫、滝口雅文 (2001) Ncf 蛋白による HLA-Class I

特異的 CTL の抗原認識に与える影響 (液性因子産生能への影響). 第 49 回日本ウイルス学会学術集会、大阪.

- (2) Hirofumi Akari, Akio Adachi, Klaus Strebel (2001) The HIV-1 Vpu as an inducer of apoptosis: implication of the role of NF- κ B. 第 49 回日本ウイルス学会学術集会、大阪.
- (3) 藤田美歌子、宮浦麻記、吉田亜希子、櫻井明子、足立昭夫 (2001) T 細胞株における HIV-2 Vpx と Vpr の機能解析. 第 49 回日本ウイルス学会学術集会、大阪.
- (4) 藤田美歌子、櫻井明子、宮浦麻記、吉田亜希子、足立昭夫 (2001) 増殖性の異なる HIV-1 Vif 点変異体の系統的な作製. 第 49 回日本ウイルス学会学術集会、大阪.
- (5) 藤田美歌子、吉田亜希子、宮浦麻記、櫻井明子、足立昭夫 (2001) SIV Gag CA の一部を持つハイブリッド HIV-1 の構築. 第 49 回日本ウイルス学会学術集会、大阪.
- (6) 藤田美歌子、櫻井明子、宮浦麻記、吉田亜希子、足立昭夫 (2001) 増殖性の異なる HIV-1 Vif 変異体の系統的な作製. 第 15 回日本エイズ学会学術集会、東京.
- (7) 藤田美歌子、宮浦麻記、吉田亜希子、櫻井明子、足立昭夫 (2001) T 細胞株における HIV-2 Vpx と Vpr の機能解析. 第 15 回日本エイズ学会学術集会、東京.
- (8) 藤田美歌子、吉田亜希子、宮浦麻記、櫻井明子、足立昭夫 (2001) SIV Gag CA の一部を持つハイブリッド HIV-1 の構築. 第 15 回日本エイズ学会学術集会、東京.

(9) 富山宏子、明里宏文、足立昭夫、滝口雅文 (2001)Nef 蛋白による HLA-ClassI 分子の発現低下が HIV-1 特異的 CD8T 細胞の抗原認識に与える影響. 第 15 回日本エイズ学会学術集会、東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図の説明

図 1 HIV アクセサリー蛋白質の研究戦略。本研究課題における研究標的、目的、手法、目標などを示した。

図 2 HSIV の Gag キャプシドの構造。Gag キャプシドに関するハイブリッドウイルスである HSIV の構造とヒト細胞への感染性を図示した。各種クローンは pNL432 を基に部位特異的変異導入法により作製した。上段は HIV-1 NL432 のキャプシドの構造 (H はヘリックス構造、CypA はサイクロフィリン A 結合領域を表わす)。ND, not determined.

図 3 HIV-1 Vif システイン領域変異体の複製能。非許容細胞と準許容細胞 (Vif 欠損体に対して) を標的細胞とした時の各変異体の複製能を示した。変異体の名称と変異体におけるアミノ酸も示してある。各種クローンは pNL432 を基に部位特異的変異

導入法により作製した。Cell-dependent は標的細胞依存性の意味。

図 4 HIV-2 Vpx 変異体の複製能。HSC-F 細胞でのウイルス複製能を示した。変異体の名称と変異体におけるアミノ酸も示してある。各種クローンは pGL-AN を基に部位特異的変異導入法により作製した。

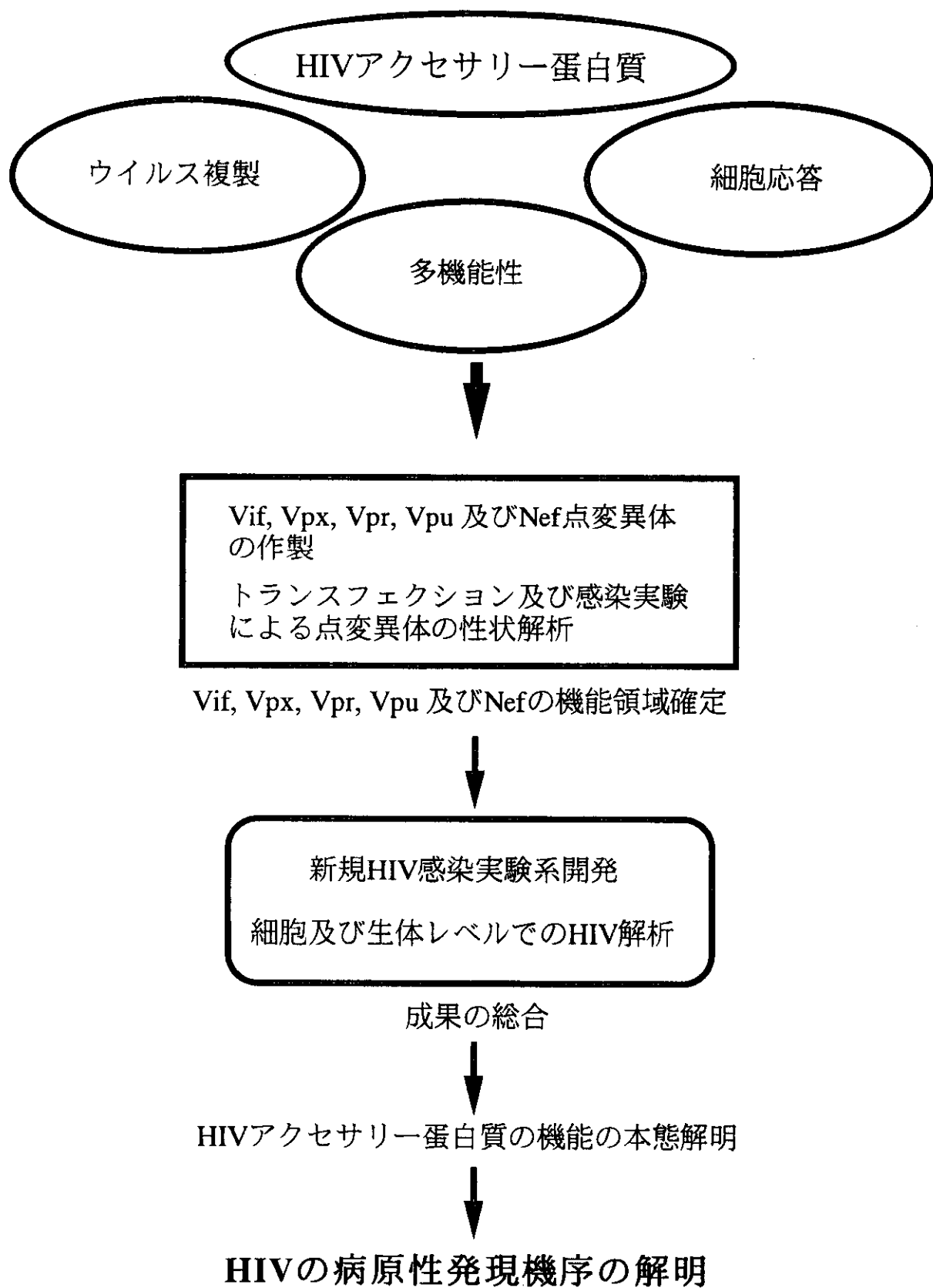
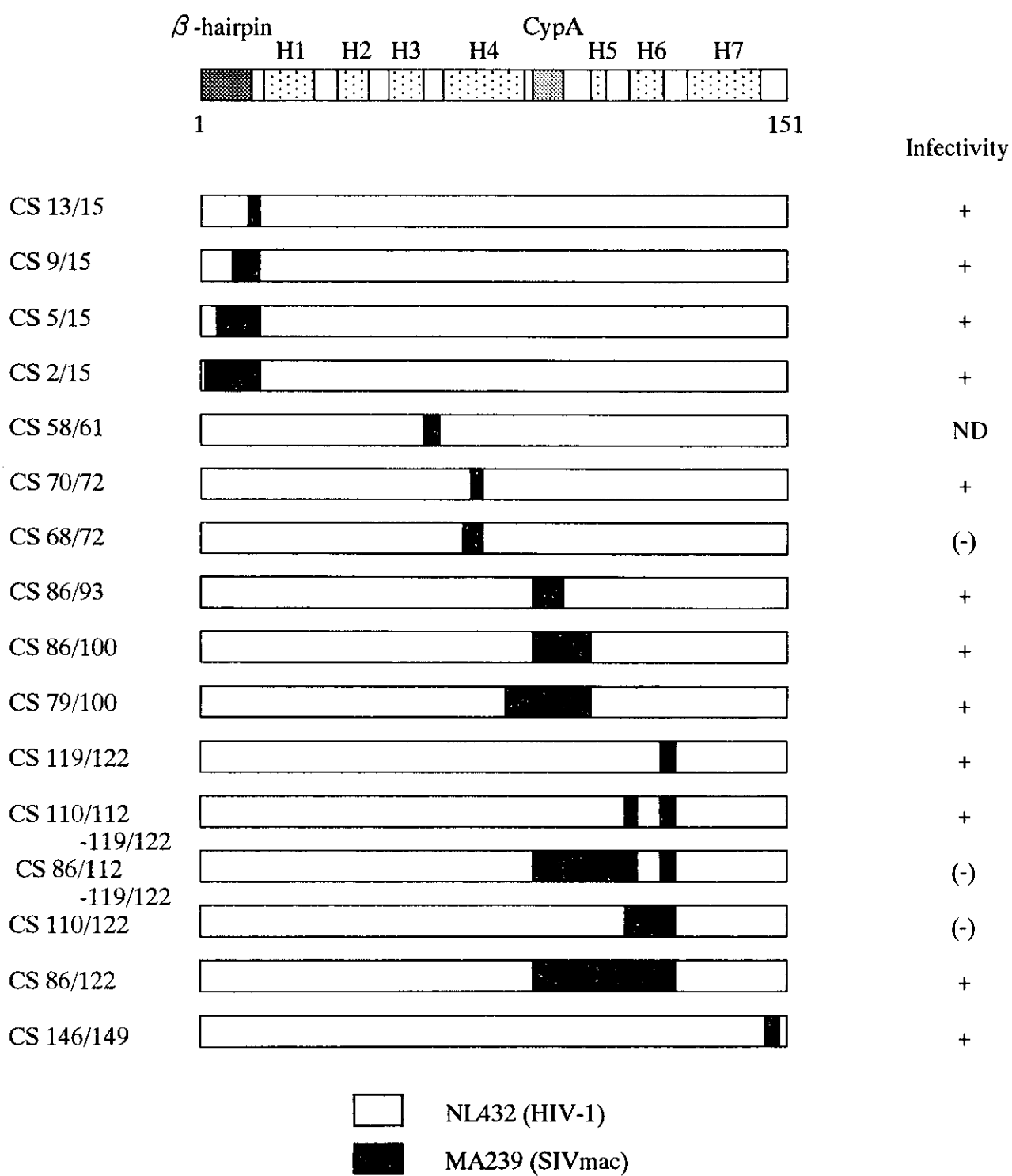
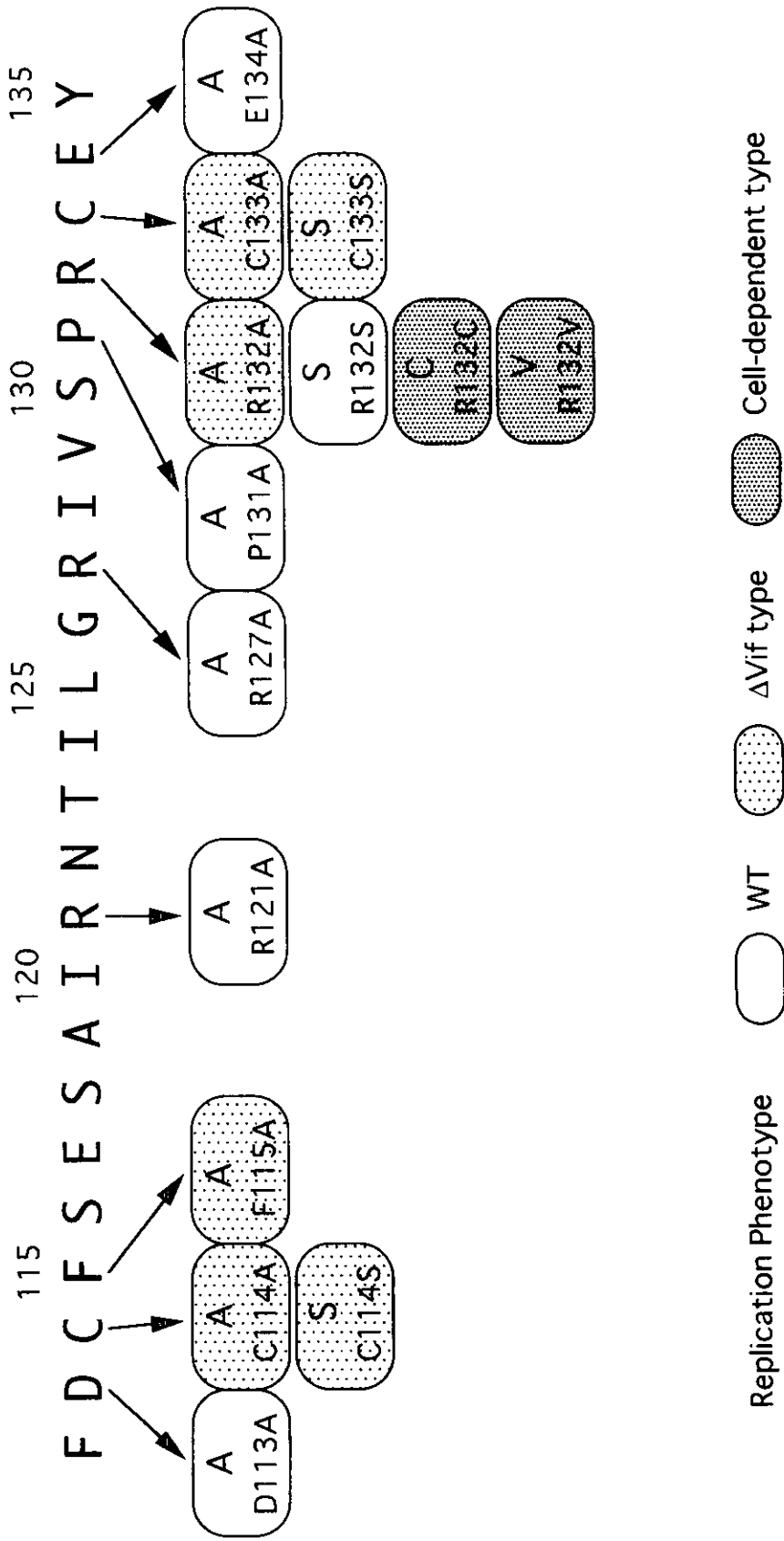


図 1



☒ 2

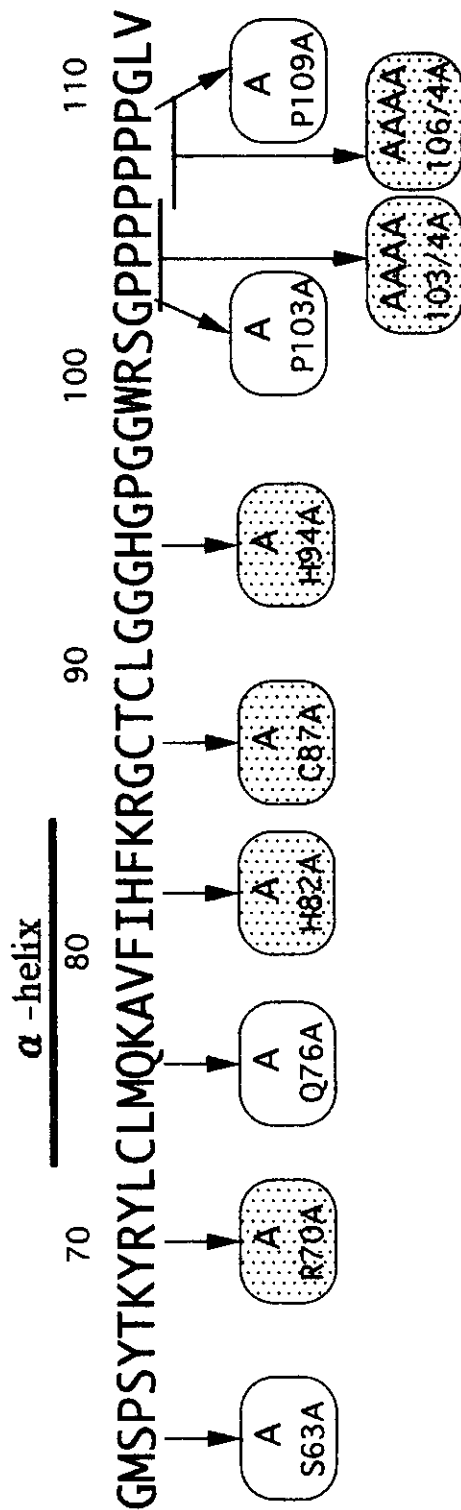
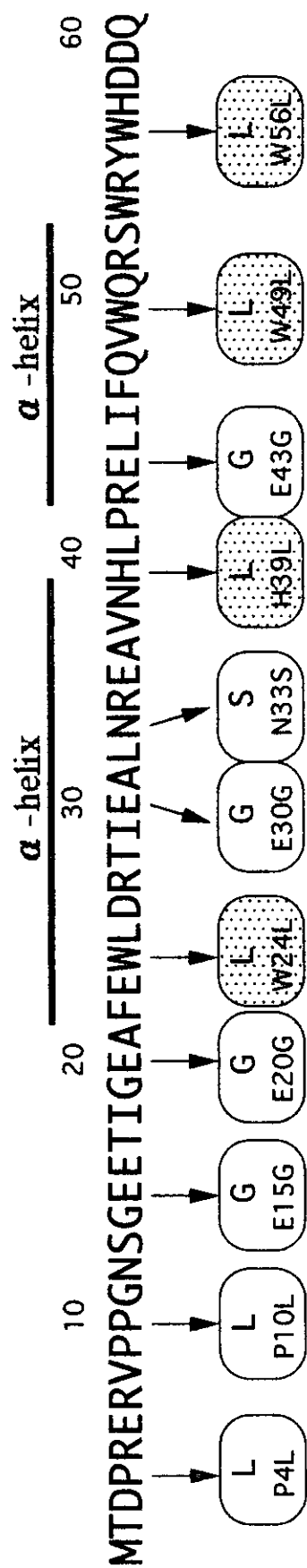


Growth ability of Vif hydrophilic region mutants of HIV-1

Clone	Sequence (Amino acid 88-93 of NL Vif)	Growth in	
		M8166	H9
NL432(wt)	E W R K K R	+	+
NL-f90/3A	E W A A A R	+	+
NL-f90/4A	E W A A A A	+	+
NL-f88/6A	A A A A A A	+	+
NL-f90/3E	E W E E E R	+	+
NL-f90/4E	E W E E E E	+	+
NL-f88R/90/4E	R W E E E E	+	+
NL-fE88d	W R K K R	+	(-)
NL-fw89d	E R K K R	+	(-)
NL-fr90d	E W K K R	+	+
NL-fk91d	E W R K R	+	+
NL-fk92d	E W R K R	+	+
NL-fr93d	E W R K K	+	+
NL-frKK90d	E W R	+	(-)
NL-fE88A	A W R K K R	ND	+
NL-fE88D	D W R K K R	ND	+
NL-fw89A	E A R K K R	ND	+
NL-fw89Y	E Y R K K R	ND	+

ND, not determined.

表 1



Replication Phenotype ○ WT ● ΔV_{px} type ☒ 4

13. 日本伝播HIV-1集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析

分担研究者 仲宗根正 国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官

研究要旨：日本に蔓延しているHIV-1に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本のHIV-1集団についてそのウイルス遺伝子・分子生物学的特徴および分子力学的構造を経年的に明らかにすることを目的とし、今年度は以下の研究成果を得た。

① Subtype Bに限って見ると、日本への流入初期のHIV-1集団と、ここ数年のHIV-1集団のV3遺伝子多様性とV3推定構造の多様性は、急速に増大する方向へは推移していない。すなわち、その遺伝子学的多様性と構造学的多様性をほぼ維持しているHIV-1集団である。

② 超高感度RT活性測定法を開発した。これによるとウイルス0.8copy相当量のRT活性を検出できる。培養上清については測定可能にも関わらず、臨床サンプル（血漿）が測定できないことが確認された。今後の課題である。

協力研究者

原敬志 国立感染症研究所・エイズ研究センター
本多三男 同

A. 研究目的

日本に蔓延しているHIV-1に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本のHIV-1集団についてそのウイルス遺伝子・分子生物学的特徴および分子力学的構造を経年的に明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1) V3領域における日本伝播HIV-1 Subtype B集団の遺伝子学的均一性及びアミノ酸配列から計算される分子力学的構造の均一性の推移

既に報告したHIV-1 Subtype B集団を対象にした。すなわち、1988-93年の91症例（旧HIV-1集団）と1996-98年の84症例（至近HIV-1集団）である。本2集団については、経年的に遺伝子学的多様性をほぼ維持している集団であることを確認している。

蛋白構造解析ソフト（MOE: molecular operating environment）を用い、PDBに登録されているV3部3次元構造をテンプレートに、対象のV3アミノ酸配列からその3次元構造を計算し

構築した。さらに、各々の集団のconsensus sequenceについても3次元構造を計算しモデル化した。最後に、consensus sequenceに対して対象のRMSD (root mean square distance)を各々算出し、2集団でその値の比較検討を行った。なお、RMSDは3次元構造の相同性の指標であり、構造が似通っているほど、その数値は0に近づく。

(2) 超高感度RT活性測定法の確立

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

C. 研究結果

(1) V3領域における日本伝播HIV-1 Subtype B集団の遺伝子学的均一性及びアミノ酸配列から計算される分子力学的構造の均一性の推移

旧HIV-1集団のRMSDは0.1471～0.7585

(mean±SD=0.3388±0.1520)であった。対して至近 HIV-1 集団の RMSD は 0.1599 ~ 0.7543 (mean±SD=0.3797±0.1628)であり、数値的には後者の方が相同性が低かったが、両者の値に統計学的有意差は認められなかった。(図1)

(2) 超高感度RT活性測定法の確立

Real-Time Amp-RTで合成HIV-RTを測定したところ、1.0~10⁶U/mlの広範囲で濃度依存性に測定可能(相関係数0.97以上)であった。さらに SHIV(Simian-Human Immunodeficiency Virus)を測定したところ、やはり800~8x10⁸/mlの広範囲で濃度依存性に測定可能(相関係数0.97以上)であった。ダイナミックレンジの広い、簡便で大量検体処理が可能なHIV-1逆転写酵素活性高感度測定法の確立にめどがたつたと考えられる。しかしながら、培養上清中のRT活性については測定可能にも関わらず、臨床サンプル(血漿)が測定できないことが確認された。今後の課題である。

D. 考察

日本のHIV-1 Subtype B集団は10年ほどの時間を経ても、遺伝子学的にはほぼ均一な集団であることを過去に報告した。他のサブタイプが流入・増加しつつあることから全体的には多様化が徐々に進んでいるとは言え、サブタイプB集団に限って言えば、多様性はプラトーに達している、あるいは、他の多様なサブタイプB流入阻止に成功している、と考えられる。このことは標的がある範囲内に定まりつつあると理解でき、ワクチン開発戦略を立てる上で有利な情報と言える。しかしながら、このデータは遺伝子情報そのもの、あるいはそれから演繹された1次元アミノ酸配列によるものである。例えば、アミノ酸には親水性のものと疎水性のものがあり、それ故、1個のアミノ酸の変化が3次元構造的には大きな影響を及ぼすことも当然考えられる。この場合、遺伝子学的に均一であっても、3次元構造的には多様である可能性もある。今回、我々は、アミノ酸配列から分子力学的に予想される構造解析を行った。それによると、日本のHIV-1 Subtype Bの新旧集団では、分子力学的構造上も多様性がほぼ維持して推移していることが確認できた。結晶化しMRIで実際に構造解析したデータには劣ると想像されるも、少なくともワクチン開発戦略上悪い情報ではないと考えられる。今後も経年的にデータを追って行き

たい。なお、2集団のCD4細胞数と血漿ウイルス量を現在解析・収集中で、それを含めてまとまり次第、誌上発表予定である。

新規手法を用いた超高感度RT活性測定法の開発は、本研究課題に関連して次の目的で遂行中である。これも既報の、遺伝子学的薬剤耐性ウイルスの増加にも関わらず、ウイルス生物学的な活性の指標であるウイルス分離率が下がり続けている現象の機序を明らかにする目的である。本法は、最終的には薬剤耐性RT活性測定法へと昇華したい。これにより、遺伝子学的薬剤耐性と酵素学的薬剤耐性の相関性が検討可能となる。また、1ウイルスが持つRT活性値も算出できることから、ウイルス活性/感性感ウイルス量のパラメータとしての可能性もある。さらには、種々のrecombinant RT(耐性導入RTも含む)の1分子あたりのRT活性が算出可能となることから、各々のRT活性の比較が容易となる。このように適用範囲の広い有用な方法であるが、残念ながら、現バージョンでは血漿サンプルの測定に難があることが今年度明らかになった。原因は、RT-PCRの組成ではなく、恐らくはサンプル調整液にあると考えられる為、原因追及後、解決し、再現性と簡便性に優れた完成版を早く開発したい。

E. 結論

① Subtype Bに限って見ると、日本への流入初期のHIV-1集団と、ここ数年のHIV-1集団のV3遺伝子多様性とV3推定構造の多様性は、急速に増大する方向へは推移していない。すなわち、その遺伝子学的多様性と構造学的多様性をほぼ維持しているHIV-1集団である。

② 超高感度RT活性測定法を開発した。これによるとウイルス0.8copy相当量のRT活性を検出できる。培養上清については測定可能にも関わらず、臨床サンプル(血漿)が測定できないことが確認された。今後の課題である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

厚生科学研究費補助金 (エイズ対策研究事業)
分担研究報告書

(1) **Nakasone T.**, Sakai K, Ami Y, Izumi Y, Takahashi E, Sasaki Y, Takizawa M, Suzaki Y, Shinohara K, Honda M. Genetic and biological characterization of a highly pathogenic molecular clone, SHIV-C2/1 KS661. *J Med Primatol* 2002 (in press)

(2) K. Mori, Y. Yasutomi, S. Ohgimoto, **T. Nakasone**, S. Takamura, T. Shioda and Y. Nagai. A quintuple deglycosylation mutant of SIVmac239 in rhesus macaques. Robust primary replication, tightly contained chronic infection and elicitation of potent immunity against the parental wild type strain. *J Virol*. 2001;75:4023-4028.

(3) T. Hara, N. Yoshino, N. Takayama, M. Minamitani, S. Naganawa, H. Ohkubo, M. Takizawa, Y. Izumi, M. Kantake, S. Suzuki, M. Takano, T. Kita, R. Totani, Y. Nagai, M. Honda and **T. Nakasone**. Presence of multiple HIV-1 subtypes among mothers and children in Japan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2001;17(6):569-575.

2. 学会発表

1. Shinohara, K., Sakai, K., Takahashi, E., Izumi, Y., Ami, Y., Sasaki, Y., Suzaki, Y., Ando, S., **Nakasone, T.** and Honda, M. Cynomolgus monkey HIV/AIDS model using a pathogenic molecular clone of a simian-human immunodeficiency virus. 13th Joint Meeting of AIDS Panels, Japan-US CMSP. (Kumamoto), 2001年

2. Honda, M., Matsuo, K., **Nakasone, T.**, Ami, Y., Ando, S., Kaizu, M., Izumi, Y., Yoshino, N., Takizawa, M., Someya, K., Ohsu, T., Shinohara, K., Sasaki, Y., Suzaki, Y., Sakai, K., Yamada, T. and Yamazaki, S. Efficacy if a human immunodeficiency virus vaccine regimen consisting of recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) and vaccinia virus DIs strain both of that express whole Gag antigen of HIV-1. 13th Joint Meeting of AIDS Panels, Japan-US CMSP. (Kumamoto), 2001年

3. Honda, M., Matsuo, K., **Nakasone, T.**, Izumi, Y., Hamano, T., Ami, Y., Ohsu, T., Kaizu, M., Takizawa, M., Hara, T., Takahashi, E., Sasaki, Y., Shinohara, K., kanekiyo, M., Hamatake, M., Kurata, T. and Yamazaki, S. Update on the Issues of collaborative HIV

clade E vaccine development. International meeting on "Thai and Japan collaboration project research and development of HIV/AIDS vaccine" (Chonburi, Thailand), 2001年

4. **Nakasone, T.**, Sakai, K., Ami, Y., Shinohara, K., Izumi, Y., Takahashi, E., Sasaki, Y., Takizawa, M., Suzaki, Y. and Honda, M. Genetic and biological characterization of a molecular clone, SHIV-C2/1 KS661, derived from a highly pathogenic SHIV-C2/1. International meeting on "Thai and Japan collaboration project research and development of HIV/AIDS vaccine" (Chonburi, Thailand), 2001年

5. Izumi, Y., Ami, Y., Ohsu, T., Matsuo, K., **Nakasone, T.**, Kaizu, M., Someya, K., Takahashi, E., Shinohara, K., Yamazaki, S. and Honda, M. Immune induction and protection of monkeys vaccinated with recombinant vaccinia DIs-simian immunodeficiency virus (SIV)-Gag. International meeting on "Thai and Japan collaboration project research and development of HIV/AIDS vaccine" (Chonburi, Thailand), 2001年

6. 本多三男、**仲宗根正**、松尾和浩、泉泰之、浜野隆一、大洲竹晃、滝澤万里、染谷健二、海津雅彦、原敬志、川原守、堀端重男、兼清優、浜武牧子、網康至、阪井弘治、篠原克明、佐々木裕子、倉田毅、山崎修道 リコンビナントHIVワクチンのプレクリニカルトリアル 第42回日本熱帯医学会大会、2001年

7. **仲宗根正**、阪井弘治、網康至、泉泰之、高橋栄治、佐々木裕子、須崎百合子、篠原克明、本多三男 強病原性SHIV-C2/1由来分子クローンウイルスによる感染発症サルモデル系の確立 第15回エイズ学会学術集会・総会、2001年

8. **仲宗根正**、Walid Heneine、本多三男 HIV-1 逆転写酵素活性高感度測定法 (Amp-RT/TaqMan) の開発 第15回エイズ学会学術集会・総会、2001年

9. 泉泰之、網康至、大洲竹晃、松尾和浩、**仲宗根正**、海津雅彦、染谷健二、高橋栄治、篠原克明、本多三男 弱毒化ワクシニアDIsベクターを用いたリコンビナントDIs/SIV-Gagワクチンによる病原性キメラウイルスの感染防御 第15回エイズ学会学術集会・総会、2001年

10. 松尾和浩、泉泰之、大洲竹晃、浜野隆一、

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

網康至、坂井弘治、仲宗根正、永井美之、山崎修道、本多三男 SIVmac由来Gag蛋白質を発現する組み替えBCG及び組み替えワクシニアウイルス DIs株によるカニクイザルでの免疫誘導能と感染防御能の評価 第15回エイズ学会学術集会・総会、2001年

11. 村上利夫、網康至、吉野直人、滝澤万里、仲宗根正、松下修三、江田康幸、本多三男、前田敏宏 ヒト化抗HIV-1モノクローナル抗体KD-247のSHIV-C2/1を用いたin vivo薬効評価と健康人における安全性及び薬物動態の検討 第15回エイズ学会学術集会・総会、2001年

12. Nakasone T, Sakai K, Ami Y, Izumi Y, Takahashi E, Sasaki Y, Takizawa M, Suzaki Y, Shinohara K, and Honda M. GENETIC AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF A HIGHLY PATHOGENIC MOLECULAR CLONE, SHIV-C2/1 KS661. 19th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (Puerto Rico)、2001年

13. Sakai K, Shinohara K, Takahashi E, Izumi Y, Ami Y, Suzaki Y, Ando S, Nakasone T, and Honda M. MOLECULAR CLONING OF A PATHOGENIC SIMIAN-HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS FOR HIV/AIDS MONKEY MODEL, Sixth International Congress on AIDS in Asia and the Pacific (Melbourne)、2001年

14. 小峯志保子、早川智、鈴木（唐崎）美喜、山本樹生、仲宗根正、泉泰之、網康至、本多三男、西成田進 妊娠カニクイザルに接種したHIV/SIVキメラウイルスの動態 第16回日本生殖免疫学会、2001年

15. 梶田賢司、早川智、本多三男、シェイク・アリムザマン、千島史尚、鈴木（唐崎）美喜、山本樹生、仲宗根正、泉泰之、網康至、小峯志保子、根本則道 HIV/SIVによる妊娠カニクイザル子宮内感染モデル 第16回日本生殖免疫学会、2001年

16. 原敬志、仲宗根正、吉野直人、杉浦互、喜多恒和、戸谷良造、浜野隆一、Tawee Chotpitayasunondh, Pajit Warachit、本多三男 HIV母子感染の感染性に関する免疫学的、ウイルス学的特性の解析 第31回日本免疫学会総会、2001年

17. 滝澤万里、千葉丈、仲宗根正、浅野敏彦、本多三男 HIV/AIDSサルモデルにおけるBCGワクチン免疫能の評価 第31回日本免疫学会総会、

2001年

18. 仲宗根正 エイズワクチン開発における非ヒト霊長類エイズモデル 化学及血清療法研究所セミナー、2001年

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Comparison of RMSD of V3 Loop between Old Japanese HIV-1 and Recent Japanese HIV-1

Group	RMSD of V3 Loop	
	Range (minimum~maximum)	mean ± SE
Old (n=83)	0.1471~0.7585	0.3388 ± 0.1520
Recent (n=62)	0.1599~0.7543	0.3797 ± 0.1628

} n.s.

3D structure of V3 loop was modelled and each RMSD was calculated by using MOE

14. T細胞サブセットと HIV-1 トロピズム

研究要旨 HIV-1 感染後の AIDS 病態進行とともに、HIV-1 トロピズムが M-tropic から T-tropic へと変化するケースが多い。一方、HIV-1 感染者の CD38 陽性細胞の割合は病態進行とともに増加することも知られている。私たちは、CD4 陽性 T 細胞を CD38 サブセットに分画後に、それぞれの HIV-1 トロピズムを検討し、CD38 陽性分画が T-tropic HIV-1 に、逆に CD38 陰性分画が M-tropic HIV-1 に高感受性を示すことを明らかにした。本年度は、その機序を検討し、CD38 陽性 T 細胞サブセットの T-tropic HIV-1 高感受性には自ら産生する IL-4 が関わっており、侵入以降の過程が亢進していることを明らかにした。

分担研究者 生田和良
(大阪大学微生物病研究所・教授)
協力研究者 白神未来、J. Alejandro Palacios、
李永剛、辻祥太郎
(大阪大学微生物病研究所)

A. 研究目的

AIDS 病態の進行は HIV-1 の負荷と相関することが明らかにされている。HIV-1 は、多様な CD4 陽性の宿主細胞から産生され、したがってその感染・複製様式も多様である。一般に、感染後の長期にわたる無症候性キャリア期は M-tropic な性状を示すのに対し、病態が進行し、AIDS 発症期になると T-tropic な性状に変化する場合が多いことも明らかにされている。したがって、HIV-1 感染後の AIDS 病態機序の解明には、HIV-1 の主な宿主細胞である CD4 陽性 T 細胞のサブセットにおける HIV-1 トロピズムを明らかにし、それぞれのサブセットにおけるウイルス複製様式を明らかにすることが前提になると考えられる。

私たちは、AIDS 病態進行とともに、CD38 陽性細胞の割合が上昇することが明らかにされている点に着目し、この CD38+ と CD38- サブセットの HIV-1 トロピズムを検討してきた。その結果、CD4+CD38+ T 細胞サブセットは T-tropic HIV-1 に、逆に CD4+CD38- T 細胞サブセットは M-tropic HIV-1 に高感受性を示した。そこで、このような顕著な違いがウイルス複製のどの過程で生じているのかについて検討した。

B. 研究方法

非感染ドナーの PBMC から MACS を用いて、活性化マーカー CD25、HLA-DR 陰性の CD4+CD38+ および CD4+CD38- サブセットを分離した。

CD38+ と CD38- サブセットの表面抗原は、フローサイトメトリー法により比較検討した。

各サブセットへのウイルス感染には、それぞれの分画 1×10^6 に対し、M-tropic HIV-1 (Ba-L) または T-tropic HIV-1 (LAI, NL432 および初代分離株である 17-3-6 および 0-4-26) 300 ng を 37°C、1 時間吸着させ、PHA (または IL-4)、

IL-2 存在下で 3 日間、さらに IL-2 存在下で 8 ~ 9 日間培養を行い、上清中のウイルス量 (抗原検出 ELISA) を定量した。また、両分画を PHA、または抗 CD3 抗体で 3 日間刺激後の培養上清中の IL-4、IFN- γ の産生量は ELISA により定量した。

また、VSV-G 発現ベクターと cotransfection することにより作製した VSV-G-pseudotype HIV-1 ウイルス (pNL432 由来の、*nef* 遺伝子に luciferase 遺伝子を挿入) を用いて、CD38 サブセットへの感染実験を行い、ウイルス複製程度は luciferase 活性の測定により定量した。

C. 研究結果

CD4+CD38+ と CD4+CD38- サブセットの表面抗原を比較した結果、CD4、CXCR4 発現に両サブセットで差は認められなかったが、CCR5 陽性細胞の割合は CD38- サブセットで高かった。

両分画へ異なるトロピズムを示す HIV-1 を感染し、PHA で 3 日間刺激した場合のウイルス産生量を比較した結果、CCR5 発現の結果に一致して Ba-L 株は CD38- サブセットで顕著な増殖を示した。しかし、CXCR4 発現は両サブセットに差異が認められなかったにもかかわらず、LAI、NL432、初代分離株は CD38+ サブセットで顕著な増殖を示した。また、PHA 刺激の代わりに、PHA で 3 日間刺激後の CD38+ サブセットの培養上清を添加したところ、CD38- サブセットの培養上清を添加した場合に比べ、CD38+ サブセットにおける LAI 産生は有意に亢進した。しかし、CD38+ サブセットの培養上清を CD38- サブセットに添加しても LAI 産生の亢進は弱かった。

PHA もしくは抗 CD3 抗体刺激後の両サブセットのサイトカイン産生量を比較検討したところ、CD38+ サブセットは Th2 サイトカインである IL-4 の産生能が高く、逆に CD38- サブセットは Th1 サイトカインである IFN- γ 産生能が高いことが明らかとなった。そこで、HIV-1 感染後の PHA 刺激の代わりに、IL-4 を添加した場合のウイルス複製を検討した。その結果、CD38+ サブセットでの T-tropic HIV-1

産生が亢進され、CD38-サブセットでは亢進されなかった。一方、抗 IL-4 中和抗体存在下では、PHA 刺激後の CD38+サブセットにおける T-tropic HIV-1 の産生は阻害された。

次に、この機序を検討するために、フローサイトメトリー法によりウイルスレセプターおよびコレセプターの発現の違いを比較したが、PHA や IL-4 刺激により若干の CXCR4 発現の亢進が認められたが、CD38+と CD38-サブセット間で差異は認められなかった。また、CD4 発現程度においても両者で差異は認められなかった。実際、T-tropic HIV-1 の吸着量において両サブセット間で差異が認められなかった。また、IL-4 レセプターの発現程度も両サブセットで差異が認められなかった。

そこで、VSV-G-pseudotype HIV-1 ウイルスを用いた感染実験（感染後に PHA 刺激）を行ったところ、CD38+サブセットにおいては弱い感染複製 (luciferase 転写活性) が認められ、同じ条件下で CD38-サブセットでは認められなかった。また、IL-4 刺激を行うと、CD38+サブセットで顕著な luciferase 転写活性の上昇が認められた。一方、CD38-サブセットではほとんど活性が認められなかった。

一方、T-tropic HIV-1 感染後のインテグレーション効率を Alu-PCR 法により比較したところ、両サブセット間で顕著な差異は認められなかった。

現在、IL-4 刺激後の STAT 6 のリン酸化点度、および Cyclin T1 について、CD38-と CD38+サブセット間での比較解析を行っている。

D. 考察

CD4+CD38+サブセットは T-tropic HIV-1 に高感受性であり、その機序として、本サブセット自ら高産生する IL-4 がウイルス産生の亢進に関わっていることが明らかとなった。さらに、この高産生は、HIV-1 のレセプターおよびコレセプターの発現が関わるウイルス吸着・侵入段階の促進ではなく、少なくとも侵入以降の、IL-4 刺激により活性化される過程、恐らくインテグレーション後の転写過程に依る亢進に基づいていると考えられた。この転写促進宿主因子として、Cyclin T1 や IL-4 刺激後に活性化される STAT6 などの関与が考えられ、現在、両サブセット間で比較解析を行っている。今後、この HIV-1 転写過程を阻害する薬剤開発の可能性を模索したい。

また、病態進行に伴う HIV-1 トロピズムの M-tropic から T-cell tropic へのシフトにこの CD4+CD38+サブセットが関与している可能性が示唆された。

E. 結論

HIV-1 の標的である CD4+ T 細胞のうち、CD38+サブセットは T-tropic HIV-1 に、CD38-サブセットは M-tropic HIV-1 に高感受性であった。前者におけるウイルス高産生は、自ら産生する IL-4 により、吸着・侵入以降の過程によってウイルス産生を亢進している結果と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Horikoshi, H., Kinomoto, M., Sasao, F., Mukai, T., Luftig, R. B. and Ikuta, K.: Differential susceptibility of resting CD4⁺ lymphocytes to a T-tropic and a macrophage (M)-tropic human immunodeficiency virus type 1 is associated with their surface expression of CD38 molecules. *Virus Res.* 73, 1-16, 2001.
- Komoto, S., Kinomoto, M., Ibrahim, M. S., Zhong, Q., Wattana, A., Ayuthaya, P. I. N., Otake, T., Mori, H., Oishi, I., Kurosu, T., Takahashi, H., Mukai, T., and Ikuta, K.: Low or no antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 Nef in infected carriers with subtype E, in contrast to subtype B that showed antibodies preferentially recognizing subtype-specific Nef epitopes. *Vaccine* 19, 3019-3032, 2001.
- Auwanit, Q., Mukai, T., Ayuthaya, P.I.N., Kurata, T., and Ikuta, K.: Full-length sequences of two subtype E HIV-1 isolates from 1995 samples of patients with sexually transmitted diseases in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 867-871, 2001.
- Kurosu, T., Mukai, T., Auwanit, W., Ayuthaya, P.I.N., Ikuta, K.: Variable sequences in the long terminal repeat and its downstream region of some of HIV-1 subtype E recently distributing among Thai carriers. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 863-866, 2001.
- Mukai, T., Kurosu, T., M. Kinomoto, Komoto, S., Shiraga, M., Auwanit, W., Ikuta, K.: Construction and in vitro characterization of a molecularly cloned human immunodeficiency virus type 1 library. *Vaccine*, in press.
- Horikoshi, H., Kinomoto, M., Kurosu, T., Komoto, S., Shiraga, M., Otake, T., Mukai, T., and Ikuta, K.: Resting CD4⁺ T cells with CD38⁺CD62L⁺ produce interleukin-4 which contributes to enhanced replication

- of T-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Virology*, in press.
- Komoto, S., Kinomoto, M., Horikoshi, H., Shiraga, M., Kurosu, T., Mukai, T., Auwanit, W., Otake, T., Oishi, I., and Ikuta, K.: Ability to induced p53 and caspase-mediated apoptosis in primary CD4⁺ T cells is variable among primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press.
- Tobiume, M., Fujinaga, K., Suzuki, S., Komoto, S., Mukai, T., and Ikuta, K.: Extracellular activates signal transduction pathway from Ras to mitogen-activated kinase cascades that leads to activation of human immunodeficiency virus from latency. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press.
- Mukai, T., Komoto, S., Kurosu, T., Palacios, J.A., Li, Y.-G., Auwanit, W., Tatsumi, M., Ikuta, K.: Construction and Characterization of an Infectious Molecular Clone Derived from the CRF01_AE primary isolate of HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, in press.

2. 学会発表

- 白神未来、堀越東子、木ノ本正信、河本聡志、向井徹、生田和良. CD4+CD38+ T細胞サブセットの T-tropic HIV-1 に対する高感受性機序について. ウイルス学会, 2001.
- 河本聡志、木ノ本正信、白神未来、黒須剛、大竹徹、大石功、生田和良. HIV-1 臨床分離株感染 PBMC において誘導される p53→ミトコンドリア→カスパーゼを介するアポトーシス. ウイルス学会, 2001.
- 木ノ本正信、向井徹、小林剛、直江真里、生田和良. HIV-1 感染者由来 PBMC 内プロウイルスから分子クローンライブラリー作製の試み. ウイルス学会, 2001.
- 黒須剛、李永剛、向井徹、河本聡志、生田和良. HIV-1 サブタイプ C Tat の高活性. ウイルス学会, 2001.
- Jose-Alejandro Palacios、向井徹、小林剛、生田和良. Construction and characterization of a molecular clone from HIV-1 provirus in persistently infected cell clone producing noninfectious doughnut shaped particles with high syncytia-formation ability. ウイルス学会, 2001.
- 河本聡志、木ノ本正信、白神未来、大竹徹、大石功、生田和良. HIV-1 臨床分離株の PBMC におけるアポトーシス誘導能の違い. エイズ学会, 2001.
- 木ノ本正信、黒須剛、河本聡志、生田和良、

- HIV-1 サブタイプ C Tat の高活性. エイズ学会, 2001.
- 白神未来、堀越東子、木ノ本正信、河本聡志、向井徹、生田和良. CD4 陽性 T細胞 CD38 サブセットと HIV-1 感受性. エイズ学会, 2001.