

## 15. 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

HIV-1感染症における血中SDF-1濃度の診断的価値について  
分担研究者 田代 啓 京都大学・遺伝子実験施設・助教授

### 研究要旨

HIV感染症の進行度の検査による判定は、現在のところ、進行度の定義そのものとしてCD4細胞数、及び血中viral loadが用いられている。本研究では、第3の検査項目候補として、特に従来のCD4細胞数や血中viral loadでは予測し得ない「エイズ随伴症候群出現」と「患者体内でのHIVウイルスの指向性変化」について、血中SDF-1値が、診断と治療にどの程度役に立ち得るかを評価することを目的に、米国のコホート試料を用いて詳細に検討中であると同時に、SDF-1のAIDS病態、及びHIVウイルス増殖制御での役割を解明する。分担研究者が93年に単離・命名・解析したSDF-1（ストロマ細胞由来因子、Tashiroら *Science* **261**, 600-603, 1993）は、T細胞指向性HIV-1ウイルスの感染補助受容体の本来の生理的リガンドである。分担研究者らはこれまでの厚生科学研究費エイズ対策事業の成果として、血中SDF-1定量法を樹立した上で、正常ヒト血中SDF-1値を解明したとともに、実際に患者血中で観察されたSDF-1濃度が、HIV感染補助受容体CXCR4のSignificant down modulationをひきおこすことを、*vivo*で示した。また、「HIV-1感染者群の血中SDF-1濃度は非感染者群に比べて高い」こと及び、「HIV-1感染者の進行群で血中SDF-1がより高い」ことを、日本のHIV-1感染者と非感染者の血中SDF-1濃度を測定・比較することにより見出した（Ikegawaら 論文発表1）。SDF-1タンパク質が*in vitro*実験でHIV-1感染を阻止すること、*SDF1* 遺伝子の多型によってAIDS発症が遅延すること（Winkler, Tashiroら *Science* **279**, 389-393, 1998）等と合わせ、血中SDF-1濃度がHIV感染症の進行や随伴症候群の出現や、HIV-1ウイルスの患者体内での指向性変化予測の指標となることが期待される。本研究では、血中SDF-1濃度が、HIVの病態進行度やHIVウイルスの指向性変化、随伴症候群の出現と相関して臨床的に有用かどうかを、これまで密接に共同研究してきた米国NCIのO'Brien博士らと引き続き共同で、米国のコホートを用いて検討している。現在、ダブルブラインド測定作業中である。予備的にHIV感染者血中SDF-1濃度とCD4値をプロットしてその相関を調べた。相関係数は-0.21であり、諸パラメーターのうち、CD4とviral loadの相関に次いで高い相関を示した。

#### A. 研究目的

本研究では、分担研究者が昨年度までに厚生科学研究費エイズ対策事業の成果として達成した、「血中SDF-1定量法を樹立した上で、正常ヒト血中SDF-1値を解明したとともに、実際に患者血中で観察されたSDF-1濃度が、HIV感染補助受容体CXCR4のSignificant down modulationをひきおこすことを*vivo*で示したこと」、と「HIV-1感染者群の血中SDF-1濃度は非感染者群に比べて高い」こと及び、「HIV-1感染者の進行群で血中SDF-1がより高い」こと（Ikegawaら, 論文発表1）に立脚して、下記の

目標を掲げて研究する。

HIV感染症の進行度の検査による判定は、現在のところ、進行度の定義そのものとしてCD4細胞数、及びCD4とよく相関する指標として血中viral loadが用いられている。本研究では第3の検査項目候補として、血中SDF-1値が診断と治療にどの程度役に立ち得るかを評価することを目的に、米国のコホートを用いて詳細に検討する。血中SDF-1値が、CD4細胞数や血中viral loadでは予測し得ない、「HIVウイルスの患者体内での指向性の変化」と「エイズ随伴症候群出現」の予測に有用であるかどうかは、特に意

義深いので詳しく検討する。

日本にはエイズコホートがないため、世界最大級のサンプル数を利用できるO'Brien博士との共同研究で目標の達成を図る。この研究は、「SDF-1のHIV-1感染症での役割」と「エイズ発症遅延の分子メカニズム」の科学的解明の鍵となる意義をもつ。

上記研究を米国NCIのO'Brien博士らとの共同で行っている。O'Brien博士らとの共同研究の良い点は、十分なサンプル数があるため群を細かく分けて統計解析できることである。大規模に行うため、バラバラに小さいコホートを解析する場合に比べて、重大情報の見落としが少なくなることが期待できる。SDF-1のエイズ病態での役割について、必要不可欠な科学的情報を得ることが出来るのみならず日常検査項目として有用かどうかの検討まで一気に出来ることが期待できる。特に「HIV-1ウイルスの患者体内での指向性変化」や「エイズ随伴症候群出現」を予測できれば、投薬方針にまで影響を与えることは自明である。

## B. 研究方法

本研究計画は、方法として早稲田大学・CRESTの松本教授らと共同研究した「高感度イムノアッセイ法」（CREST事務を通して田代を筆頭著者とする国内外特許出願済み）を用いている。検討材料の米国の諸AIDSコホートは、O'Brien博士、Winkler博士との共同研究として使用するものである。本年度は米国サンプルの一部を受け取り、信頼できる測定には、何 $\mu$ lの血清またはプラズマを必要とするかを明らかにしている。測定値は安定で再現性に優れたものであるが、厳密な統計処理に耐えられるように、同時に5回測定することを3回繰り返している。フィコール分画ではなく、プラズマを用いた方が測定値の信頼性が高いことから、現在、米国でフィコール分画しか採取していなかった例についてプラズマサンプルの採取が行われている。1000~3000検体の5回測定を3回繰り返す作業自体は、京都大学で行っている。その測定結果を、当グループの池川博士が渡米してNCIに持参して、米国の統計専門家とともに詳細に臨床データと対応させた統計解析を行い、池川博士を筆頭著者とする論文を作製することが合意されている。病期ごと、もしくは随伴症候群出現、生

体内でのウイルス指向性変化、もしくはHIV-1ウイルスの患者体内での指向性変化、もしくは3'A変異との相関が見られた場合、臨床的に有用かどうかを、米国コホートのサンプルの詳細な臨床情報を用いて検討する手筈になっていると同時に、日本の各施設のご協力をお願いして、日本の臨床症例で同じことが言えるかどうかをさらに検討する予定である。まず米国サンプルで研究を実施するのは、それが本課題については結果に到達するための最速の方法であるからである。

## C. 研究結果

現在、米国から送られたサンプルをダブルブラインドで測定中である。

エイズ制御遺伝子を次々と明らかにしたO'Brien博士やWinkler博士らのコホート試料の「血清分画」と称する物は、サイトカイン測定に最適化された物ではないことが判明した。すなわち、O'Brien博士やWinkler博士らのコホート試料は、遺伝的検討を第一の目的として、そのためのDNA抽出原料の血球細胞分取を優先しており、細胞をとったフィコール分画の残り「血清分画」としている。そのため、本当の血清とは異なる成分となり、必ずしも血中サイトカイン測定に適さない。そのため、Winkler博士と話し合い、新たに、われわれが推奨する方法で血液採取をやり直すことになり、そうして新たに採取した血液サンプルの一部を受け取ってSDF-1濃度を測定した。

予備的にSDF-1濃度とCD4値をプロットしてその相関を調べた。相関係数は-0.21であり、諸パラメーターのうち、CD4とviral loadの相関に次いで高い相関を示した。

我々は、信頼できる唯一のSDF-1測定系をもつところから、研究課題に関連した共同実験を行って研究の幅をひろげた。SDF-1が生体内で高値を示すときどのような影響が血球細胞に及ぶかをアデノウイルスベクターでSDF-1をマウスに強制発現して、血中SDF-1値をモニターしつつ検討したところ、血液幹細胞などに変動がみられた(Hattoriら、論文発表2)。

## D. 考察

現在、米国から送られたサンプルをダブルブラインドで測定中であり、サンプル数がそろ

えば統計解析する。

血中SDF-1を測定する意義について考察しておく。主たるHIV-1ウイルス感染の場であるヒト胸腺やリンパ節内のSDF-1タンパク量測定は、現実には不可能なので、それら局所のSDF-1濃度と平衡関係にあり、局所SDF-1濃度を反映することが期待できる循環血中のSDF-1濃度を測定することが最良の策であると考えられる。もしも仮に血中SDF-1値がCXCR4値に比べて遙かに低値であったり、タイトに固定されていて個体間に差がすくなければ、「HIV-1感染者の血中SDF-1濃度は非感染者に比べて有意に高い。」ということにとどまっていでもその先の展開がないと考えられるが、実際には、「個体間の差が10数倍に及ぶこと。」及び「CXCR4のKD値付近のSDF-1タンパク濃度をもつ個体から、その1/10以下の個体までいること。」及び「*vivo*でCXCR4のKD値付近のSDF-1タンパク濃度でCXCR4のダウンモジュレーションがおこることを世界で初めて示したこと。」という具体的データにより、「内因性SDF-1タンパクが、確かにHIV感染症の病原性決定因子の一つであることを、世界で最初に実験的に明らかにしている。これにより、HIV感染者の血中SDF-1レベルを測定することにより、予後予測と治療方針決定への応用の検討ができるようになった。また、「*SDF1* 3'A遺伝子多型がAIDS随伴症候群の一つである非ホジキンリンパ腫の危険率を高めている」という指摘があり（満屋ら、*Blood* 93, 1999）、その対策を早期に実行する観点からも、HIV感染者全員に血中SDF-1タンパクレベル検査をルーチン検査する意義があると考えられる。

予備的にSDF-1濃度とCD4値をプロットしてその相関を調べた。相関係数はであり、諸パラメーターのうち、CD4とviral loadの相関に次いで高い相関を示したことから、上記の議論は支持される。

## E. 結論

現在、米国から送られたサンプルをダブルブラインドで測定中である。血中SDF-1値がエイズの病態把握と予後予測（特にエイズ随伴症候群としての非ホジキンリンパ腫対策やウイルスの指向性変化の予測）のためのルーチン検査の一つに加えるかどうかを検討する方向でのさらなる研究進展が望まれる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Ikegawa, M., Yuan, J., Matsumoto, K., Herrmann, S., Iwamoto, I., Nakamura, T., Matsushita, S., Kimura, T., Honjo, T. and Tashiro, K. Elevated Plasma SDF-1 Protein Level in the Progression of HIV-1 Infection/AIDS *AIDS Research and Human Retroviruses* 17, 587-595 (2001)

2. Hattori, K., Rafii, S., Heissig, B., Tashiro, K., Honjo, T., Takeno, M., Shieh, J-H, Hackett, N. R., Crystal, R. G., and Moore, M. S. Plasma elevation of stromal derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 97, 3354-3360 (2001)

### 2. 学会発表

・池川 雅哉, 袁 景利, 松本 和子, 岩本愛吉, 中村哲也, 松下修三, 木村哲也, 本庶 佑, 田代 啓・「HIV-1感染者血中SDF-1濃度の上昇とAIDS発症との相関について」・第6回CRESTシンポジウム単一分子・原子レベルの反応制御・平成14年1月

・池川 雅哉, 袁 景利, 松本 和子, 岩本愛吉, 中村哲也, 松下修三, 木村哲也, 本庶 佑, 田代 啓・「HIV-1感染者血中SDF-1濃度の上昇とAIDS発症との相関について」・第74回日本生化学会年会・平成13年11月

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

16. ヒト PBMC で増殖する CRF02\_AG 組換え体の感染性分子クローンの分離とその構造  
分担研究者：巽 正志 (国立感染症研究所獣医科学部)  
共同研究者：鷹架美香子、飛梅 実、松田道行 (大阪大学微生物病研究所)

研究要旨：ガーナ人男性から分離された HIV-1 を MAGIC5A 細胞と Long PCR を用いた HIV Trapping System で完全長の DNA クローン p97GH-AG2 を得た。全長の塩基配列を決定し近隣結合法によって系統樹を作成した。またその感染性を検討したところ以下の成績を得た。①p97GH-AG2 は、ナイジェリア由来の IbNG 株に代表される CRF02\_AG と同一のサブタイプ A/G 間の組換え構造をもつが、いままで報告された CRF02\_AG で subtype G 領域が最も少ない。② 97GH-AG2 は X4R5 型ウイルスである。③97GH-AG2 は、MAGIC5A や HOS, NP2 細胞など不死化細胞のみならず、PBMC でも増殖した。近年西中央アフリカ流行の形成に関与している代表的な CRF の一つである CRF02\_AG の感染性分子クローンの分離に世界に先駆けて成功した。

1. 目的

現在までの HIV 研究は主に欧米に流行している subtype B の Molecular clones を用いてその病原性を担う遺伝子領域が検索されてきた。しかしながら最近の HIV-1 の感染中心は欧米からアフリカ、東南および南アジア地域に移行しており、そこで主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype C, subtype A および CRF01\_AE 組換え体が多くを占めている。HIV-1 subtype B は異性間の感染も認められるが主に homosexual および麻薬静注者などの risk group に侵淫していることが知られている。一方、Subtype 間における感染経路による感染効率の違いが指摘されているにもかかわらず、subtype B 以外の感染性クローンが得られていないため、その違いに由来する HIV-1 subtype 間の遺伝子構成の相違に基づく病原性解析の進展における隘路になっている。本研究は subtype B 以外の発展途上国で流行している subtype の感染性クローンの樹立を試み、

将来のワクチン開発および subtype によるウイルスの病原性解析の分子基盤を整備することを目的とする。

昨年度本研究班で、西・中央アフリカにおいて爆発的に感染者が増加している circulating recombinant form (CRF02\_AG) の感染性分子クローン p97GH-AG1 の分離を報告したが、その感染性は CD4/CXCR4/CCR5 発現株化細胞では示されたが、PBMC では検出限界であった。そこで本年度は新たにヒト PBMC で感染増殖するクローンの樹立を目指した。

2. 方法

HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告した HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系(HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系)により行った。対象としたウイ

ルスは HIV-1 subtype A の流行地域である中央アフリカ象牙海岸に位置するガーナ国で、日本国の JICA 支援により現地の野口英世記念医学研究所で採取された検体である。1997 年に、化膿性皮膚炎に罹患した 36 歳のガーナ人男性から分離された MH63a 株を MAGIC5A 細胞でブランク純化した。このウイルス株は gag (p17 領域)および env (C2/V3 領域)の Genotype は subtype A であった。得られたウイルスを感染させた HeLa4.5 細胞 (CD4 および CCR5 発現 HeLa 細胞株)からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として、Long PCR を行い 5'-および 3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長の DNA クローンを得た。12 個のクローンのうち、1 個 (p97GH-A1) が HeLa4.5nEGFP で顕著な細胞融合を示したが、その上澄は MAGIC-5A で感染性を示さなかった。p97GH-A1 の全塩基配列のドラフトを決めたところ、Pol 領域に 1 塩基の挿入を認めたことから、その下流のユニークな EcoR I 部位を含めた Primer と 5'LTR Primer で Genome 左半分を組換えて感染性クローン p97GH-AG2 を樹立した。その感染性は MAGIC-5A 細胞株および PBMC で検討した。

### 3. 結果

ブランク純化した HIV-1 MH63a 株を感染させた HeLa4.5 細胞ゲノムを鋳型に図 1 のように 5'LTR から PBS までの Short Genome を pBR322 由来 Vector pBRSK9 に組み込み、PBS

領域近傍の多くの HIV-1 で保存されて、なおかつ Unique Site ある Kas I/Nar I と Rare Cutter Not I を利用して 9.0 Kbp に及ぶ Near-Full Length genome を Long PCR で増幅し、両制限酵素で処理した後組込んだ。組み込まれた Plasmid を、Tat 蛋白発現により核移行シグナルを付加した EGFP を HIV-LTR 下流に組み込んだ発現ユニットを有する細胞株 HeLa 4.5/nEGFP に Transfection 2 日後核仁に EGFP 発現陽性で Syncytium 形成が陽性になるクローンを選択した。しかしながらその培養上澄には、次の MAGIC-5A 細胞への感染性をもつウイルス粒子は p24 抗原が陽性であるのにも拘わらず得られなかった。Monitor 細胞株 HeLa 4.5/nEGFP で EGFP 陽性で、Syncytium 陽性なことから Tat, Rev および Env 蛋白は有効に機能していることが推察されることから、構築した全長ゲノム Plasmid の右半分はその Functionality が保存されていると考えた。そこで左半分のゲノムの入換え戦略をとった。即ち pol 領域にある Unique Site EcoR I site を含む Reverse Primer を作製し、3'LTR の塩基配列から 5'LTR Start からの Forward Primer の組み合わせで 5'LTR から pol まで増幅し、両酵素処理後、先の全長 Plasmid と組換えた。Transfection 後の培養上澄を MAGIC-5A に感染させ感染陽性であるクローン p97GH-AG2 を選別した。

この感染性クローン p97GH-AG2 の全塩基配列 9708 bp を決定し遺伝子構造を解析したところ以下の事項が判明した。

#### 全長の系統樹 (Fig.1)

97GH-AG1 の全塩基配列を決定し、9つのウイルス蛋白をコードするオープンリーディングフレームが存在することを確認した。

他の代表的な Subtype の reference sequence との Alignment をもとに Kimura-2-parameter 法により genetic distance matrix をつくり、近隣結合法にて系統樹を作成したところ、97GH-AG2 は IbNG に代表される CRF02\_AG 群と 100% の bootstrap 値でクラスターを形成したが、他の CRF02\_AG 群と 99% の bootstrap 値で離脱していた。このことから 97GH-AG2 は CRF02\_AG に属するが、ユニークな組換体であることが判明した。

#### Bootscanning Analysis (Fig.2)

97GH-AG2 の Break Point の位置を比較するために Bootsanning 解析を行った。500bp ほどのブーツトラップ系統樹から得られたブーツトラップ値を 100bp 毎ずらして計算していきグラフにプロットした。グラフが上の方にあるほど、そのサブタイプとの間で形成されるクラスターの信頼性が高いことを示している。この解析により 97GH-AG2 は IbNG と同様な組み換えのパターンを持つが、nef および 3'LTR 領域が subtype A に帰属し、いままで報告されているどの CRF02\_AG 組換体より subtype G に帰属する領域が少ないユニークな CRF02\_AG 組換体であることが判明した。

#### 感染実験 (Fig.3)

p97GH-AG2 を 293T 細胞に FuGene 6 を用いて transfect 2日後の培養上澄には、感染性クローン pSF2, および我々が樹立した世界最初の subtype C の感染性クローン pIndie-C1 と同等な RT 活性を検出した。この培養上澄をウイルスストックして感染実験に用いたところ、PBMC 培養で Indie-C1 と同等な増殖を認めた。一方、Coreceptor Usage を確かめるため、MAGI と MAGIC-5A を用いて検討した。その結果、97GH-AG2 は MAGIC-5A でよく増殖したが、MAGI でも低いながら有意な感染性を示したことから、X4R5 HIV-1 クローンであることが確認された。

#### 4. 考察

本年度は、昨年度に引き続き西・中央アフリカにおける流行拡大の主要な原因ウイルスとして浸淫している circulating recombinant form (CRF02\_AG) の PBMC で増殖する、現在まで報告されているどの CRF02\_AG 組換体よりも subtype G の領域が少ないユニークな感染性分子クローン p97GH-AG2 の分離に成功し、その分子遺伝子構造的特徴とウイルス学的性質について解析を進めた。

分子遺伝子学的解析の結果、p97GH-AG2 は、ナイジェリア由来の IbNG 株に代表される CRF02\_AG と同一のサブタイプ A/G 間の組換え構造をもつが、特に nef および 3'LTR 領域がこれまで報告されているどの CRF02\_AG 組換体と異なり subtype A に帰属することが明らかになった。この成績は、IbNG 株に代表される CRF02\_AG 組換体が、

新たに subtype A との nef-3'LTR 領域における組換えにより生成した可能性もあるが、いわゆる CRF02\_AG 組換体の生成は、様々な領域内で起こりうることを示している。

本研究は subtype A の感染性クローンを樹立する目的で、当初 subtype A 流行地のガーナ国で 1997 年度に分離されたウイルス株をその出発点とし、改めて gag と env 領域の塩基配列を確認の上、全長クローンの作成に取りかかった。しかしながら、昨年度に引き続き CRF02\_AG 組換体が分離された。このことは、様々な subtype が共に流行する地域では、予想以上に subtype 間の Recombination が起こり、感染効率が高い組換体の方が優勢になっている可能性がある。これらの成績はガーナ国などの西及び中央アフリカ諸国で流行している HIV-1 の subtyping は env などの限られた領域の塩基配列だけでは既に正確な感染流行状況が把握できないことをしめしている。本研究班の本来の目的からすると、現に流行が猖獗を極めていいる CRF02\_AG 組換体の感染性クローンが得られたことは、昨年の p97GH-AG1 とともに、実況に則したワクチン開発にとって、より有用な分子基盤を提供しうるクローンと考えられる。

また昨年度分離した p97GH-AG1 は細胞株でのみ感染性を示したが、今回の p97GH-AG2 は PBMC でも感染性を示し、その制限酵素パターンは酷似していることから、PBMC での増殖に必要なウイルスの分子構造に関して新たな知見が得られる可能性もある。

Subtype A の感染性クローンについては、

分離年度が早い時期のウイルス株を AIDS reagents program から入手し、改めて構築していきたい。

## 5. まとめ

近年西中央アフリカ流行の形成に関与している代表的な CRF の一つである CRF02\_AG の感染性分子クローンの分離に世界に先駆けて成功した。昨年報告した不死化細胞においては増殖できるが、PBMC 中では増殖能を欠く p97GH-AG1 とともにこの CRF に対するワクチン開発等ウイルス学的解析に資するものと期待される。

## 6. 発表論文

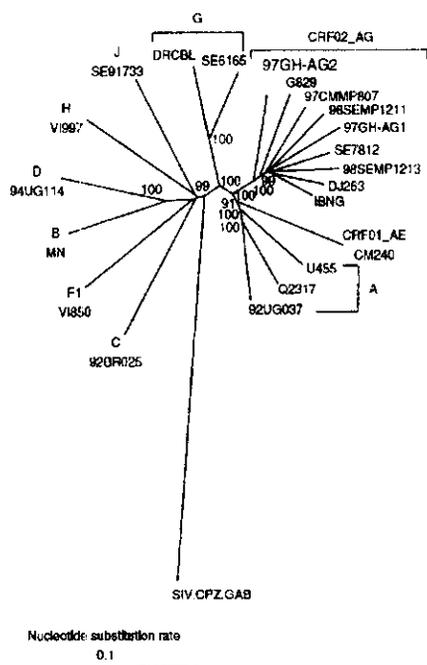
M Takahoko, M Tobiume, K Ishikawa, W Ampofo, N Yamamoto, M Matsuda and M Tatsumi : Infectious DNA Clone of HIV Type 1 A/G Recombinant (CRF02\_AG) Replicable in Peripheral Blood Mononuclear Cells. AIDS Res Hum Retroviruses 17: 1083 – 1087, 2001

M. Tobiume, K. Tokunaga, E. Kiyokawa, M. Takahoko, N. Mochizuki, M. Tatsumi, and M. Matsuda: Requirement of Nef for HIV-1 infectivity is biased by the expression levels of Env in the virus-producing cells and CD4 in the target cells Arch. Virol. 146 : 1739-1751, 2001.

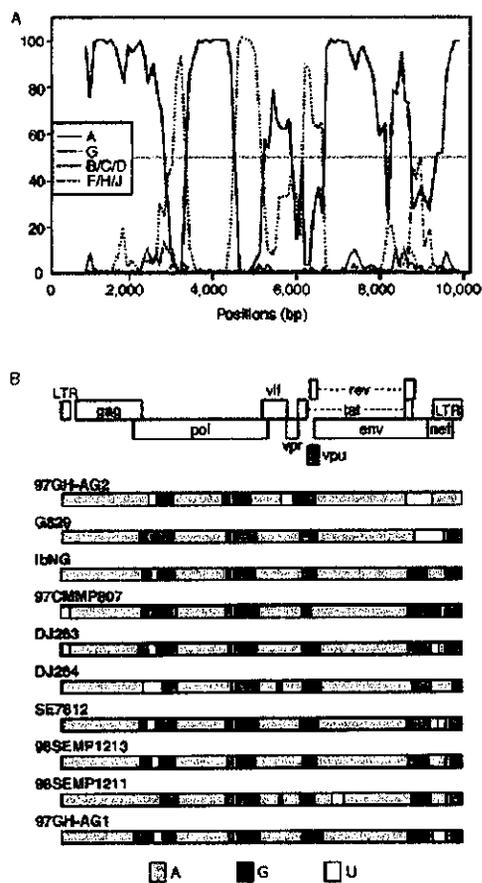
M. Tobiume, M. Takahoko, M. Tatsumi, and M. Matsuda. Establishment of a MAGI-derived indicator cell line that detects the Nef enhancement of HIV-1 infectivity with high

sensitivity. *J.Virol.Meth*: 97: 151 – 158, 2001.

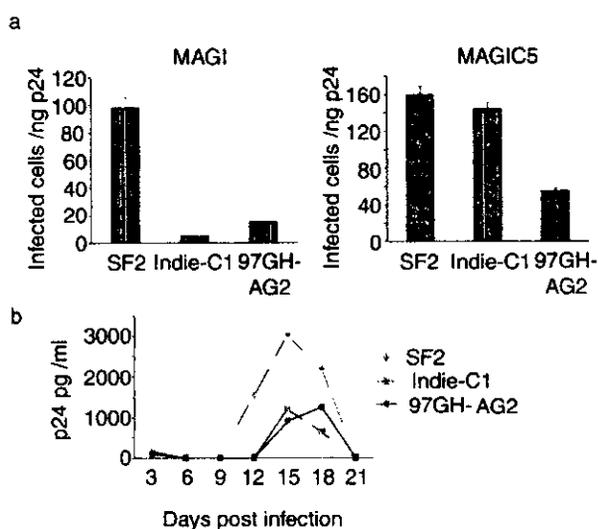
Kusagawa, S, Takebe, Y, Yang, Rongge, Motomura, K, Ampofo, W, Brandful, J, Koyanagi, Y, Yamamoto, N, Sata, T, Ishikawa, K, Nagai, Y and Tatsumi, M: Isolation and Characterization of a Full-Length Molecular DNA Clone of Ghanaian HIV Type 1 Intersubtype A/G Recombinant CRF02\_AG, Which Is Replication Competent in a Restricted Host Range *AIDS Res Hum Retroviruses* 17: No. 7; 2001



**Fig 1 Phylogenetic Tree of p97GH-AG2**



**Fig.2 Bootstrap Analysis of p97GH-AG2**



**Fig.3. Infectivity of 97GH-AG2**

17. 厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
研究報告書

「HIV 及びその関連ウィルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」班

分担研究者 横幕能行 国立感染症エイズ研究センター研究官

研究要旨 細胞障害性 T 細胞(CTL)の HIV-1 増殖抑制作用に対して、エピトープや周辺アミノ酸の変異が与える影響を詳細に検討するために、HIV-1 ベクターを用いた CTL アッセイ用標的細胞作成系を確立した。作成した標的細胞は、HLA 拘束性に CTL に認識された。臨床検体由来 Gag を発現させた場合も peptide pulse 法やリコンビナントワクシニアウイルスベクターを用いて作成した標的細胞を用いた場合の結果と一致した。

A. 研究目的

HIV-1 感染において、細胞障害性 T 細胞(CTL)は初期感染の際のウイルスの排除や HIV-1 感染者の AIDS 発症までの期間を延長するのに重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、HIV-1 は感染者の個体内で何らかの機序で CTL による感染細胞の認識から逃れて増殖を続けていると考えられている。

これまで、その機序として、Nef による MHC class I 分子の down regulation や Fas ligand の up regulation、CTL の成熟過程の障害、HIV-1 の CTL エピトープ領域におけるエスケープ変異などの検討がなされてきた。なかでも、CTL エピトープのエスケープ変異について理解を深めることは、ワクチン開発にとって用いる抗原の選択にも大きく貢献するため重要な問題である。

プロテアソームや transporter associated with antigen processing (TAP) を介する抗原提示機構は、エピトープ領域を含む周辺のアミノ酸配列によって影響をうけることが知られている。また、これらペプチド内のアミノ酸の変異に起因する MHC class I 分子との親和性のわずかな相違が、エピトープ MHC class I 複合体形成やその安定性に影響を与え、CTL による認識効率を変化させる可能性があることが報告されている。

従って、エピトープおよびその周辺領域の変異が CTL の認識効率に与える影響をより正確に検討するためには、実際の HIV-1 感染細胞における様式、量でウイルスタンパクを発現させ、細胞内の抗原提示機構を用いて標的細胞表面に提示させ、CTL による認識効率を調べる必要がある。

また、HIV-1 が非常に変異に富むウイルスであることも考慮する必要がある。従来の実験室株のみを使った実験では HIV-1 の多様性の評価が十分になされない可能性がある。

そこで、本研究においては、エピトープ領域やそれ以外の領域で起こった様々なアミノ酸変異が CTL 認識に与える影響を調べる目的で、HIV-1 感染者の体内に実際に存在するウイルスから分離した目的とする領域を、HIV-1 ベクターを用いて標的細胞に発現させる系の確立を行った。

B. 研究方法

本研究では、まず、HIV-1 タンパク質の中でも、他の構造タンパク質に比べて発現量が多く比較的変異を来たしにくいことから将来 CTL 誘導型ワクチンに用いる抗原の候補となる可能性の高い Gag に注目し、臨床検体由来の Gag を発現させることができる HIV-1 ベクターを作成し、標的細胞作製系を確立することを試みた。

HIV-1 ベクターは HXB2 をもとに作製した。任意の gag, pol などを組み込むことができるように、制限酵素部位を付加し、Env は欠損させた。nef の部分には puromycin N-acetyltransferase gene (pac) を組み込み、遺伝子導入細胞を puromycin で選択できるようにした (pCTLpac)。pCTLpac と envelope を供給する pVSV-G を COS7 細胞にコトランスフェクションし、シュードタイプウイルスを作成した。これを EB virus transformed B cell (BCL) に感染させた後、puromycin を用いて遺伝子導入細胞を選択した。HIV-1 感染者血清を用いた Western blotting により、HIV-1 タンパク質の発現が確認された。(図 1,2)

このようにして臨床検体由来の全 Gag 領域を発現する標的細胞を作製し、p17MA の HLA-A\*0201、A24 拘束性エピトープ特異的な CTL を用いて <sup>51</sup>Cr リリースを用いた CTL アッセイを行い、代表的な従来法であるリコンビナントワクシニアウイルスベクターによる方法によって作製した標的細胞を用

いた場合の結果と比較を行った。

使用した Gag 領域は、HIV-1 感染者から分離した PBMC より抽出した DNA から、PCR 法で増幅し、全長にわたって塩基配列を確認したものをを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた血液検体は、東京大学医科学研究所東大医科研・先端医療研究センター感染症分野岩本愛吉教授がインフォームドコンセントを得て採取したものを御供与いただき使用した。

### C. 研究結果

#### HLA A-24 拘束性 エピトープ KYLKHIVW 特異的 CTL を用いた CTL assay (図 3)

まず、本法により HLA-A24 を有する 5 人の異なる HIV-1 感染者から作成した BCL で標的細胞を作成し、HLA A-24 拘束性エピトープ KYLKHIVW 特異的 CTL を用いて CTL assay を行った。A24 以外は異なる HLA type の組み合わせを有する 5 つの異なる標的細胞は全て、KYLKHIVW 特異的 CTL によってほぼ同様に認識され、10 $\mu$ M の peptide pulse 法によって作成した標的細胞との認識効率に差を認めなかった。

さらに、HLA-A24 を有しない BCL を用いて作成した標的細胞は、KYLKHIVW 特異的 CTL に認識されなかった (data not shown)。

これらの結果から、本法により作成された標的細胞は、CTL によって HLA class I 拘束性に認識されることが示された。

また、エピトープ特異的な CTL を用いる場合、non-peptide pulsed BCL をコントロールとみなすことができると考えられた。

#### HLA-A\*0201 拘束性 エピトープ SLYNTVATL 特異的 CTL を用いた CTL assay (図 4)

次に HLA-A\*0201 を有する BCL を用いて標的細胞を作成し、p17MA にある HLA-A\*0201 拘束性エピトープ SLYNTVATL 特異的な CTL を用いて CTL assay を行い、10 $\mu$ M の peptide pulse 法によって作成した標的細胞との認識効率との比較を行った。

本方法により作成した標的細胞の SLYNTVATL 特異的 CTL による認識効率は、10 $\mu$ M の peptide pulse 法によって作成した標的細胞と比較した場合、再現性をもって低かった。本方法により作成し CTL assay で用いた両方の標的細胞における P24 発現量を Western blotting 法で比較したところ、

同等であり、1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個の標的細胞の 24 時間あたりの p24 抗原産生量にも差を認めなかった (data not shown)。

#### 臨床検体由来 Gag を発現する標的細胞の作成と CTL による認識、peptide pulse 法とリコンビナントワクシニアウイルスを用いて作成した標的細胞との比較 (図 5)

これまで、HXB2 の Gag について解析を行い、本法で作成した標的細胞は HLA-A\*0201 拘束性 SLYNTVATL および HLA-A24 拘束性 KYLKHIVW 特異的 CTL に認識されることが示された。臨床検体由来の Gag に含まれるエピトープの解析のために、実際に HIV-1 感染者である YAH ならびに SUH の PBMC 中のプロウイルスから分離した Gag を発現する標的細胞を、本法とリコンビナントワクシニアウイルスベクターを用いた方法で作成し、SLYNTVATL 特異的 CTL を用いた CTL assay を行い、CTL による認識効率の比較を行った。

SUH、YAH から分離したプロウイルスの gag 領域を塩基配列を解析したところ、HLA-A\*0201 拘束性エピトープのアミノ酸配列は、SUH から分離されたものは SLYNTVATL、YAH から分離されたものは SLYNTIATL であった。エピトープ近傍のアミノ酸配列は HXB2 と著変なかった。

また、作成した標的細胞から DNA を抽出し、塩基配列を解析したところ、アミノ酸配列に変異を認めなかった。

リコンビナントワクシニアウイルスのコントロールとしては、CD4 発現ワクシニアウイルスを感染させて作成した標的細胞を用いた。

本法により作成した標的細胞は、リコンビナントワクシニアウイルスで作成したものよりも、SLYNTVATL 特異的 CTL によってより効率的に認識された。

また、SLYNTVATL と SLYNTIATL は、SLYNTVATL 特異的 CTL によってほぼ同等に認識されることが示された。リコンビナントワクシニアウイルスベクターを用いて作成された標的細胞でも同様の結果を示しており、本法で作製された標的細胞を用いて、様々な変異を有するエピトープの CTL による認識効率の比較も可能であることが示された。

### D. 考察

従来、臨床検体由来のエピトープ解析を行う場合、感染者から分離されたウイルスのアミノ酸配列の情報に基づき合成したペプチドを細胞外から加え、MHC class I に結合させ

る peptide pulse 法や、リコンビナントワクシニアウイルスを感染させることによってエピトープ領域を含む HIV-1 タンパク質を細胞内で発現させる方法が行われてきた。

peptide pulse 法によれば、ペプチド合成を行えば容易に CTL アッセイのための標的細胞を作成することができる。しかしながら、細胞内で切断を受けないため、実際の抗原提示効率を反映しない可能性がある。また、大過剰量のペプチドを用いることから、MHC class I 分子との親和性のわずかな相違に起因する標的細胞表面における提示効率の差を、必ずしも反映するとは限らない。

リコンビナントワクシニアウイルスを用いる方法は、peptide pulse 法に比べて、より実際の HIV-1 感染に近い状態でエピトープが提示されると考えられる。しかしながら、ウイルスストックの準備に時間がかかることや、ワクシニアウイルス自体の細胞傷害性やワクシニアウイルス由来タンパク質が優位に発現され、目的とする HIV エピトープ抗原の提示効率に影響を与える可能性がある。また、この場合も、ウイルス由来タンパク質が実際の HIV-1 の感染と比較して過剰に発現されると考えられる。<sup>51</sup>Cr を用いた CTL アッセイにおいては、細胞障害性に起因する高いバックグラウンドシグナルも加わり、様々なエピトープ間の提示効率の差を検討することは必ずしも容易ではない。

HIV-1 の増殖を制御する MHC class I 拘束性 CTL 認識を規定するエピトープは何かを考える時、ウイルス側の要因として、エピトープまたはそれ以外の領域で起こった様々な変異が MHC class I 拘束性エピトープの提示と CTL による認識効率に及ぼす影響の解析を行うことが不可欠であると考えた。この目的のためには、HIV-1 感染者のなかに存在する様々な変異を蓄積した解析を目的とする領域を、実際の HIV-1 感染に近い形式で発現させることが重要であると考え、本法を確立した。

本法によれば、HIV-1 のプロウイルス DNA を用いてウイルス作成用のベクターの作成ができ、ウイルスストックの作成も COS7 細胞などにトランスフェクションした後の培養上清として容易に得ることができる。リコンビナントワクシニアウイルスを用いた場合に比べると、より簡単に多検体処理を同時に行うことが可能である。

しかしながら、リコンビナントワクシニアウイルスにくらべると、標的細胞作成に用いられる BCL への pseudotyped HIV-1 の感染効率は劣る。そこで、感染細胞を適当な薬剤選択マーカーを利用して選択することにし

た。我々は、pac を用いることにより、puromycin による迅速な遺伝子導入細胞の選択を可能にした。これにより、2 週間以内に HIV-1 タンパク質を発現している十分量の標的細胞のストックを作成することが可能になった。作成した標的細胞は、感染後 1 ヶ月以内では、10 $\mu$ M のペプチドを用いた peptide pulse 法によって作成した標的細胞との間に認識効率の差を認めなかった(data not shown)。従って、感染後 1 ヶ月以内であれば、CTL の認識に十分な HIV-1 タンパク質由来のエピトープを提示していると考えられた。

こうして作成した標的細胞は、凍結融解が可能である。同じストックの標的細胞を用いることにより、リコンビナントワクシニアウイルスを用いて標的細胞では困難であった異なる実験間の結果の比較が可能になると考えられる。

今回、p17 MA にあるエピトープである HLA-A\*0201 拘束性 SLYNTVATL と HLA-A24 拘束性 KYLKHIVW に特異的な CTL を用い、今回新たに確立した方法で作成した標的細胞上の HLA 拘束性エピトープの認識を確認した。HLA-A\*0201 拘束性 SLYNTVATL は、HLA-A24 特異的 KYLKHIVW に比較して、それぞれのエピトープ特異的な CTL に認識される効率が低いことが示唆された。SLYNTVATL は HLA-A\*0201 分子への結合親和性が低いことが報告されており、これを反映している可能性がある。また、本法で作成した標的細胞を用いることにより、これまでの方法よりも鋭敏にエピトープの CTL による認識効率の評価をすることができるようになる可能性がある。

また、臨床検体由来の SLYNTVATL 変異体の中に、peptide pulse 法によって作成した標的細胞は SLYNTVATL と同程度 SLYNTVATL 特異的 CTL によって認識されるが、本法により作成したその SLYNTVATL 変異体を含む全 Gag 領域を発現する標的細胞では全く認識されないものがあつた。さらに、SLYNTVATL と、この変異体を用いて、titration assay を行ったところ、認識効率に著明な差を認められないものがあつた。

エピトープの提示効率に影響を与える因子としては、プロテアソームによる processing の特異性、エピトープフラグメントの ER へ TAP 依存性輸送、MHC class I 分子とエピトープとの結合親和性、細胞表面におけるペプチドと MHC class I 分子結合体の安定性などが考えられる。エピトープ領域もしくはそれ以外の領域の変異が、これらの標的細胞表面における MHC class I 拘束性エピトープの

提示機構に顕著な影響を及ぼした例として、さらに詳細な検討を行う必要がある。

これらの結果からも、将来、細胞性免疫誘導を目的とするワクチン作成のためのエピトープの選定を行うにあたって、実験室株由来エピトープに関する解析のみでは十分ではないと考えられる。様々な変異を有する臨床検体由来のウイルスタンパク質を発現する標的細胞を作成し、MHC class I 拘束性の CTL の反応を確認し、エピトープ内やその他の部位のアミノ酸の変異が、エピトープ特異的な CTL の認識にどのように影響するか、知見を蓄積していくことが重要であると考えられる。

#### E. 結論

今回我々は、HIV-1 vector を用いた CTL 標的細胞の作成系を確立した。従来、用いられてきたリコンビナントワクシニアウイルスに比べて、ウイルス作成ベクターの組み換え作業や、ウイルスの調整が容易である。作成した標的細胞は、HLA 拘束的に CTL に認識されることが示された。本法により臨床検体由来の Gag を発現する標的細胞を作成して CTL による認識を確認すると、peptide pulse 法とリコンビナントワクシニアウイルスベクターを用いて作成した標的細胞における結果と一致した。

本法を用いて様々な臨床検体由来の HIV-1 タンパク質を発現する標的細胞を作成することにより、エピトープや周辺のアミノ酸変異がエピトープの提示や CTL による認識に与える影響を詳細に検討することが可能であり、HIV-1 が CTL の認識から逃れて増殖する機構の解析に有用であると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

###### 国際学会

Yoshiyuki Yokomaku, Koya Ariyoshi, Hideka Miura, Sachiko Tateishi, Ai Tachikawa, Aikichi Iwamoto, Wataru Sugiura, Yoshiyuki Nagai, Zene Matsuda  
Rapid generation of tailored target cells for CTL assay  
2<sup>nd</sup> AIDS Seminar in Kumamoto  
Kumamoto.2001 9

###### 国内学会

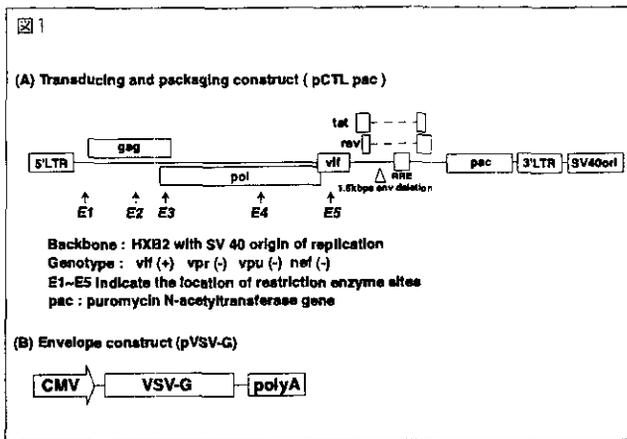
三浦秀佳、横幕能行、建石幸子、後藤美江子、川名愛、岩本愛吉、小島朝人、有吉紅也  
HIV-1 特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)による臨床株 Gag タンパクの認識効率に関する研

究

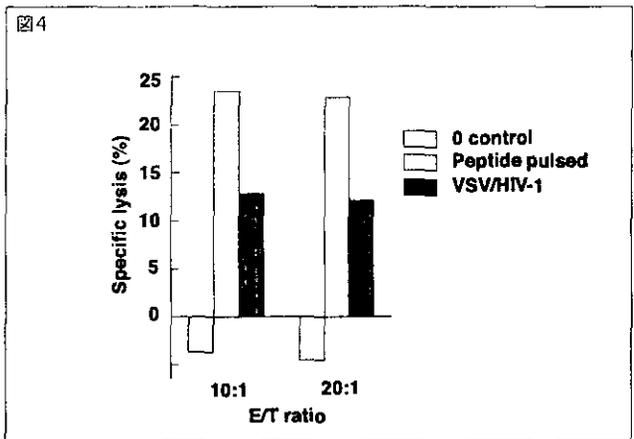
第 49 回日本ウイルス学会 大阪 2001 11

#### G. 知的所有権の取得状況

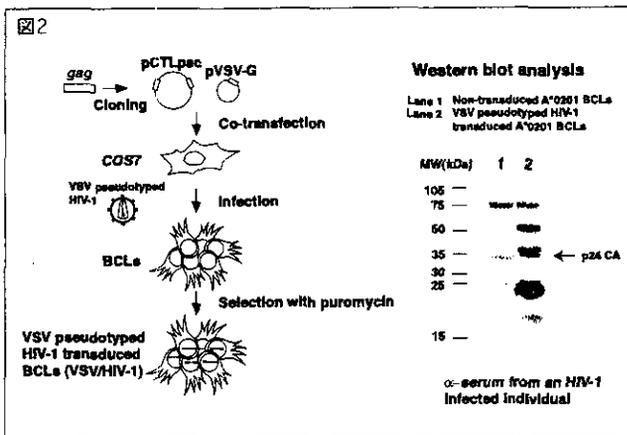
なし



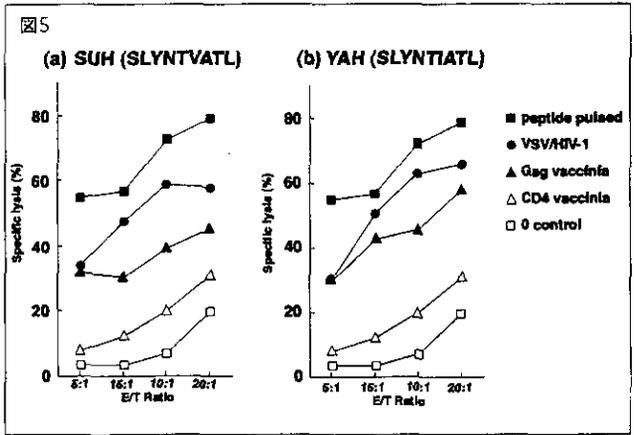
HIV-1ベクターはHXB2をもとに作製した。任意のgag, polなどを組み込むことができるように、制限酵素部位を付加し、Envは欠損させた。nefの部分にはpuromycin N-acetyltransferase gene (pac)を組み込み、遺伝子導入細胞をpuromycinで選択できるようにした(pCTLpac)。pVSV-Gはenvelopeタンパク質を供給するために用いた。



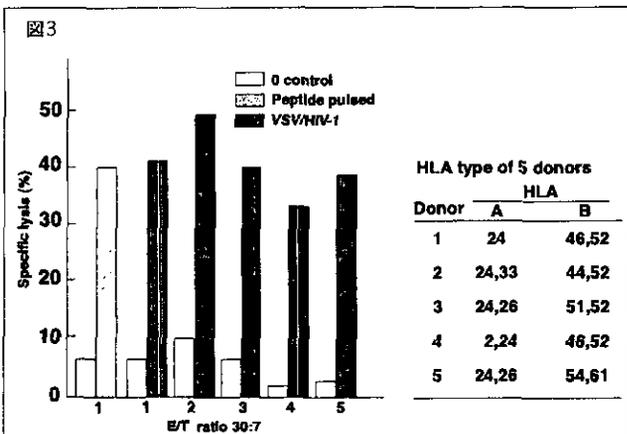
HLA-A\*0201拘束性エピトープSLYNTVATL特異的CTLを用いたCTL assay。HLA-A\*0201拘束性エピトープSLYNTVATL特異的なCTLを用いてCTL assayを行い、10mMのpeptide pulse法によって作成した標的細胞との認識効率との比較を行ったところ、本法で作成した標的細胞のCTLによる認識効率は、10mMのpeptide pulse法によって作成した標的細胞よりも再現性を持って低かった。



pCTLpacとenvelopeを供給するpVSV-GをCOS7細胞にコトランスフェクションし、シュドタイプウイルスを作成した。これをEB virus transformed B cell (BCL)に感染させた後、puromycinを用いて遺伝子導入細胞を選択した。HIV-1感染者血清を用いたWestern blottingにより、HIV-1タンパク質の発現が確認された。



HIV-1感染者であるYAHとSUHのPBMC中のプロウイルスから分離したGagを発現する標的細胞を、本法とリコンビナントワクシニアウイルスベクターを用いた方法で作成し、SLYNTVATL特異的CTLを用いたCTL assayを行い、CTLによる認識効率の比較を行った。本法により作成した標的細胞は、リコンビナントワクシニアウイルスで作成したものよりも、SLYNTVATL特異的CTLによってより効率的に認識された。また、SLYNTVATLとSLYNTIATLは、SLYNTVATL特異的CTLによってほぼ同等に認識されることが示された。



HLA A-24 拘束性エピトープKYKLVKHW特異的CTLを用いたCTL assay。A24以外は異なるHLA typeの組み合わせを有する5つの異なる標的細胞は全てKYKLVKHW特異的CTLによってほぼ同様に認識され、10mMのpeptide pulse法によって作成した標的細胞との認識効率に差を認めなかった。

## 18. 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

### HIV 増殖に関与する宿主因子のプロテオーム解析

分担研究者 松田善衛 国立感染症研究所エイズ研究センター

**研究要旨** プロテオーム解析による HIV-1 の増殖に影響を与える宿主細胞因子の検索を行う目的で、二次元電気泳動及びそれに引き続く MALDI TOF MASS を用いた解析法を導入した。モデルとして、vif 変異体を用いてその増殖を支持する細胞と増殖を支持しない細胞間での発現タンパク質の比較を行い、増殖非支持細胞に存在すると仮定されている vif 変異体増殖阻害因子を検索した。その結果、比較的安定して見い出される等電点 4.7、分子量約 90kD 付近の候補スポットを見い出した。

#### A. 研究目的

ウイルスは完全従属寄生体でありその増殖は宿主細胞機能に大きく依存することは既知の事実である。この宿主依存性の理解はウイルス増殖機構の理解及びその制御のためには必須のものである。今までウイルス増殖に影響を与える宿主因子はイーストツーハイブリッド法やディフアレンシャルディスプレイ法、あるいはアレイ技術などを用いた遺伝子解析を中心とした手法によって解析されることが多かった。近年ゲノムプロジェクトの進展及び質量分析技術の進歩により発現タンパク質を網羅的に解析する方法、プロテオミクス的手法が可能になってきた。HIV-1 の増殖に関わる宿主因子のプロテオーム解析は今までに行われてきたゲノム、トランスクリプトーム解析で得られる情報に加えて、翻訳後修飾などタンパク質の解析によってのみ得られる情報を得ることができ、他の方法との組み合わせにより HIV の増殖関連宿主因子の同定、解析に有意義な情報を提供できるものであると考えられる。本研究では宿主細胞の違いにより増殖態度に大きな影響を与える副遺伝子変異体を用いて、HIV 増殖に影響を与える宿主細胞因子同定におけるプロテオーム解析の有用性を検討することを目的とする。

#### B. 研究方法

用いる宿主細胞種によって *in vitro* での増殖態度が大きく変異することが知られている vif 変異体を実験材料として用いた。vif 変異体の増殖態度によって種々の細胞株は増殖支持細胞 (permissive cell) 及び増殖非支持細胞 (non-permissive cell) に分類される。他の研究者の報告により非支持細胞には vif 変異体の増殖を抑制する宿主因子が存在することが示唆されている。したがって数種の支持細胞 (Jurkat、SupT1、CEM) 及び非支持細胞 (H9) での総発現タンパク質 (プロテオーム) を二次元電気泳動にて展開、相互比較し MALDI TOF Mass (matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) による PMF (peptide mass fingerprinting) 解析によるタンパク質スポット同定を試みた。すなわち各細胞粗抽出液を二次元展開後、クーマシー染色し、各細胞株について複数の protein profile を作製しそれらを用いて各細胞間の比較を行った。H9 細胞に vif 変異体の増殖を抑制するタンパク質が存在するという仮説に基づき H9 細胞株にのみ見られるプロテインスポットを検索し、それをゲルから切り出し、トリプシンによるゲル内部分消化を行った後、MALDI TOF Mass 解析を試みた。得られたデータを元に MS Fit データベース検索を行いプロテインの同定を試みた。

(倫理面への配慮)

該当事項なし

### C. 研究結果

SupT1、Jurkat、CEM および H9 T細胞株の protein profile 解析を行った。用いる細胞量、溶解バッファーなどの検討により各細胞株につき得られる protein profile が安定した後、各細胞間のスポットの比較を行った。その結果、各細胞固有にみられるタンパクスポットが見いだされた。このうち等電点 4.7、分子量 90kD 付近に安定して H9 特異的に観察されるタンパクスポットが確認された。このタンパク質の同定を目的に複数枚の 2次元電気泳動ゲルから当該スポットを切り出し MALDI TOF MASS 解析を行った。この際、コントロールとしてすでに文献的に記載されているプロテインスポット(HSP60)も同様に解析を行った。解析の結果 HSP60 は Mass のシグナルも強くデータベース検索の結果でも信頼性高く同定され PMF の手法そのものには問題がないことが示された。当該スポットについても HSP60 に比べると弱いながらもシグナルが得られ、検索結果では複数の候補タンパク質が示された。候補タンパク群について等電点、分子量を実測値と比較検討した結果、カドヘリンファミリータンパク質が当該スポットに相当する可能性が示唆された。また質量分析のデータの比較から、類似タンパク質が permissive cell lines にもみられるが、H9 とは異なる分子種である可能性が示唆された。

### D. 考察

Vif 変異体における permissive, non-permissive 細胞粗抽出タンパク質のプロテオミクス解析により vif 変異体の増殖を阻害する宿主タンパク質の同定を試みた。初年度の本年は細胞抽出液の作成法、二次元電気泳動条件の検討、質量分析手法

の導入を行った。その結果 non-permissive cell である H9 に特異的にみられる複数のタンパク質スポットが見いだされた。そのうち比較的安定して見られ発現量の多い一つのスポットについて MALDI TOF Mass 解析を行った。その結果、相当するタンパク質がカドヘリンファミリータンパク質である可能性が示唆された。カドヘリンファミリータンパク質の vif 変異体増殖に対する影響については機能的検討が必要である。より発現量の少ないタンパク質の網羅的解析のためには、粗抽出液作成法の改良(カラムクロマトグラフィー、分別遠心法などの採用)による分画が必要であると考えられた。また次年度以降はリコンビナント vif タンパク質を用いた in vitro binding assay および PMF による相互作用タンパク質の同定など complexity を減少させる手法を用いることも必要であることが示唆された。

### E. 結論

各細胞株の 2次元電気泳動によるプロファイリングおよびその比較により、各細胞株に特異的に存在するタンパク質が検出できた。また、発現量の多いタンパク質については MALDI TOF Mass によりそのタンパク質の同定が容易に行えることが分かった。発現量の少ないタンパク質を含めより網羅的な解析には前処理による complexity の低減化、同定に供するタンパク質量の増加が必要であると考えられた。

### F. 研究発表

論文、学会発表とも該当なし。

### G. 知的所有権の取得状況

該当なし

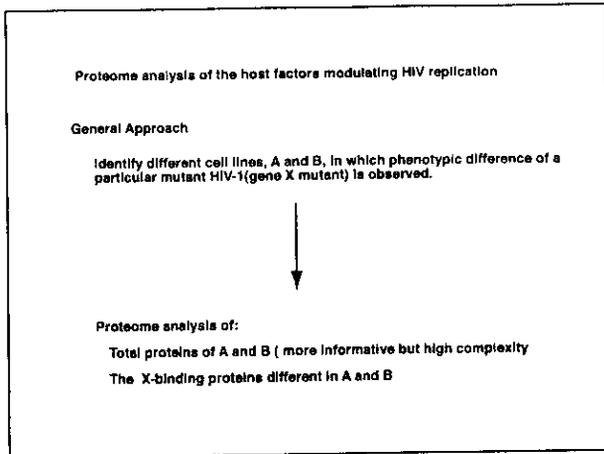


図1. HIV-1増殖に影響を与える宿主因子のプロテオーム解析 (アウトライン)

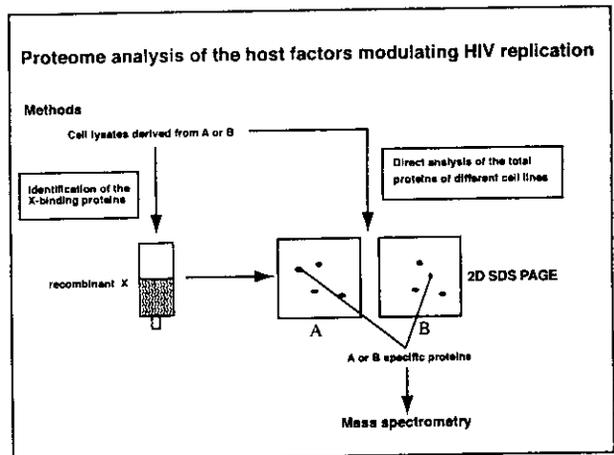


図2. HIV-1増殖に影響を与える宿主因子のプロテオーム解析 (方法)

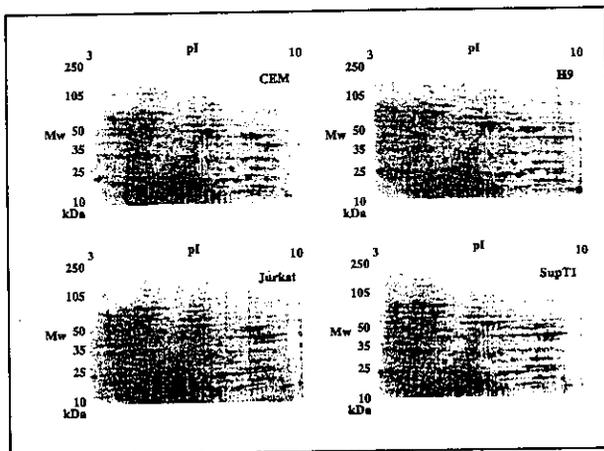


図3. Vif変異体の増殖支持T細胞株(SupT1, Jurkat, CEM)と増殖非支持T細胞株(H9)における総発現タンパク質の2次元電気泳動解析。縦軸に分子量、横軸に等電点を示した。

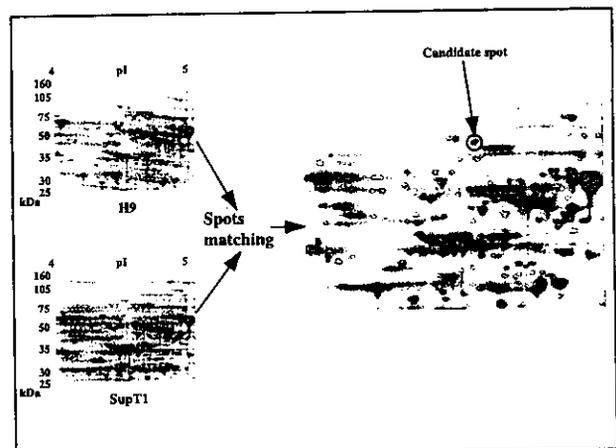


図4. H9特異的発現タンパク質の同定、2次元電気泳動にて展開したスポットをH9対SupT1、Jurkat、CEM間で比較しH9にのみみられるタンパク質を同定し質量分析に供した。

### III. 研究協力者

## 19. HIV ゲノムの二量体化に関する研究

研究協力者 櫻木淳一（大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野）

### 研究要旨

HIV-1 ゲノムのパッケージングシグナル及び二量体化シグナル（E/DLS）を含むと考えられる領域をゲノム RNA 上に複数配置することにより、HIV-1 正常粒子中に単量体化したゲノムが生成することを見いだした。多くの変異体では粒子中に二量体と単量体が混在していたが、導入変異を改変することで単量体ゲノムしか持たない粒子の作成にも成功し、ゲノム二量体化が HIV-1 のゲノムパッケージング及び正常粒子産生に必須でないことが明らかとなった。さらに現在はこの現象を応用して構築した、ゲノム二量体化を効果的に検出できるシステムを用いて二量体化領域の構造についての詳細な機能相関を明らかにすることに取り組んでいる。

### A. 研究目的

HIV-1 を含むレトロウイルスのポジティブ本鎖 RNA ゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成している。これは遺伝子組替えによって子孫に遺伝的多様性をもたらし、また片方のゲノムが傷ついていた時の補償をすることで、生き残りに有利な状況を作り出していると解釈されている。したがって HIV ゲノム二量体化の機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としている HIV の制圧に向けた糸口を示しうる。現在までにゲノム上の二量体化シグナルの同定は多くの場合人工的に合成した RNA を用いた試験管内の系により行われており、パッ

ッケージングシグナル内に存在することが示唆されている。しかし実際のウイルス粒子中では多くの因子やイベントが存在しており、RNA と緩衝液のみからなる試験管内の系の結果がそのまま当てはまるとは限らない。そこで本研究では HIV-1 ゲノム二量体化を粒子内でとらえることを目指し、二量体化領域を含むと考えられる領域をゲノム上に複数個配置することによって起こる二量体の量的・質的变化について解析を行った。

### B. 研究方法

#### 1. DNA 構築

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。ゲノムの転写開始点か

ら約 1000 塩基分の DNA 断片を切り出し、polyA 付加シグナルとスプライスシグナルを不活化する変異を導入した (E/DLS 断片)。pNL43 の Env 領域にフレームシフト変異を導入した Env 非発現変異体 pNLNh のゲノム上様々な箇所に E/DLS 断片を一つずつ挿入した複数の変異体を作成した (DD シリーズ・ DDN: Env 領域に挿入, DDS: Gag 領域に挿入, DDX: Nef 領域に挿入, DDB: Pol 領域に挿入)。pNL43 のパッケージングシグナルと Env の二重変異体 5'ss  $\beta$  glob に対しても同様の断片挿入変異体を作成した (ss シリーズ・ ssN, ssS, ssX, ssB)。DDN, ssN に関してはさらに E/DLS 断片を一つ追加挿入した変異体を作成した (DTN, sTN) (図 1)。E/DLS 断片と同領域の polyA 付加シグナルとプライマー結合領域 (PBS) を不活化した 1000 塩基の断片 ( $\Delta$ P 断片)を作成し、DDN, ssN, DTN, sTN とまったく同様の変異体を、 $\Delta$ P 断片を用いて作成した ( $\Delta$ P シリーズ・ DDN $\Delta$ P, ssN $\Delta$ P, DTN $\Delta$ P, sTN $\Delta$ P)。pNL43 のパッケージングシグナル付近 400 塩基と、Pol 領域 300 塩基を RNA 合成用ベクター pGEM3ZF(+) に挿入したプラスミド (pGEM600-1000, pGEMpol) を作成し、放射性リン標識 RNA プロブの鋳型とした。5'ss  $\beta$  glob の gag-pol

領域を削除して、HIV-1 Env 発現ベクターを作成した (5'ss ENVEXSV)。

## 2. ウイルスの精製

ヒト腎臓由来 293T 細胞にプロウイルス型 DNA をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。48 時間後に細胞上清に放出されたウイルス粒子をシュークロースクッションを通した超遠心にて回収した。ウイルスの一部を界面活性剤にてウイルスを溶解、プロテイナーース K 処理、フェノール抽出にてウイルス粒子由来 RNA を精製した。トランスフェクトした細胞も同時に回収し、細胞質 RNA を精製した。ウイルス量は p24 抗原 ELISA キットにて定量した。ウイルスタンパクの性状は HIV-1 特異的抗体とウェスタンブロット法にて確認した。

## 3. ノザンハイブリダイゼーション

回収したウイルス RNA を 5 等分し、それぞれ 25, 35, 45, 55, 65°C で 10 分間加温したのち非変性 TBE アガロースゲルにて泳動した。ナイロン膜に電氣的に転写した後固定し、RNA プロブを用いて HIV-1 ゲノム RNA を可視化した。

## 4. RNase プロテクション

ウイルス RNA と細胞質 RNA 中の HIV-1 ゲノム RNA を RNA プロブを用いて RNase プロテクションアッセイキットにて定量した。ウイルス

抗原量との量比をもとに粒子のゲノムパッケージング効率を算出した。

#### 5, ウイルス感染性定量

Env 発現ベクターとプロウイルス型プラスミドを混合してトランスフェクトすることで一過性感染能を持つウイルス粒子を作成し、変異体の一過性感染能とウイルス DNA 合成能について定量を行った。

### C, 研究結果

#### 1, 単量体ゲノムを持つ HIV-1 粒子の産生

HIV-1 の E/DLS 領域を、通常的位置に加えてもう一つゲノム上に持つ DD シリーズ変異体より産生された粒子内のゲノムの二量体化度合いを野性株と比較した。野性株ではほぼ 100%のゲノムが非変性条件下で二量体化しているのに対し、DD シリーズのゲノムはどれも 40%前後のゲノムが単量体として存在していることを見いだした (図 1)。これは今までに報告されたことのない、極めてユニークな現象である。DD シリーズを母体に通常的位置の E/DLS を削除した ss シリーズ変異体のゲノム二量体化を同様に調べたところ、これらはすべて野性株と同様に二量体化していた。このことからこの現象が同一 RNA 上の二つの E/DLS の分子内反応により起こっていることが確かめ

られた。

#### 2, ゲノム二量体化は正常粒子産生に必須ではない

E/DLS 領域を二つ持つ変異体においてもなお約半数のゲノムが二量体化していた。このことは通常的位置の E/DLS の二量体化機能が挿入した E/DLS より優勢なためではないかと考え、機能的に等価な E/DLS をゲノム上に持つ変異体の作成を試みた。DDN, ssN を母体に、E/DLS をさらに一つ追加挿入した変異体 DTN, sTN を作成した。一つのゲノム上に E/DLS の数は野性株及び ssN は一個、DDN, sTN は二個、DTN は三個になる。このうち sTN の二個の E/DLS はともに挿入断片由来であることから、等価であると考えられた。これらの変異体由来の粒子内ゲノムを比較すると、予想通り DTN では単量体の量が減少し、一方 sTN では完全な単量体ゲノムのみを含んだ粒子が産生していた (図 1)。これらの粒子タンパクは野性株と同様に成熟していたことから、ウイルスゲノム二量体化はゲノムパッケージング、粒子産生及び粒子の成熟には必須でないことが初めて明らかとなった。これらのウイルスの感染能測定を試みたが、挿入配列に存在する PBS により異常な逆転写開始が起こることが予想されたため、挿入配列の PBS を削除し