

胞と HeLa 細胞を用いた。

ウイルス：GFP を発現する HIV ベクター DNA (CS-CDF-CG-PRE)、HIVgag-pol 遺伝子を発現するプラスミド DNA (pMDLg/pRRE)、rev 遺伝子を発現するプラスミド DNA (pRSVrev)、そして、Pseudo type ウイルス産生のため外被蛋白質として VSVG 蛋白質を発現するプラスミド DNA (pMD.G) をカルシウム法にて 293T 細胞にコトランスフェクションを行なった。その培養上清を高速遠心機により濃縮し、ウイルス液とした。ウイルス感染価の測定は MT-4 細胞へ感染させ、3 日後の GFP 陽性細胞数を FACS により測定した。なおプラスミド DNA は筑波大学三好浩之博士と Salk 研究所の Verma 博士より分与された。PIC の抽出：一細胞あたり 200 感染価のウイルスを  $2 \times 10^6$  の MT-4 細胞に感染させ、6 時間後に K バッファー (0.025 % digitonin, 20 mM HEPES, 150 mM KCL, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 10 U aprotinin) 液にて細胞膜を破壊し、細胞質分画を回収した。

PIC の試験管内インテグレーションアッセイ：標的 DNA として DIG ラベルプラスミド DNA と PIC を 37°C にて 2 時間反応し、anti-DIG 抗体ラベルビーズにより、DIG ラベル DNA を回収した。熱変性後、遊離一本鎖 DNA 中の HIV DNA 量を測定した。この測定には下記のように R/U5 特異的 HIV プライマーを用いた。同時に希釈プラスミド DNA を用いて算出されるスタンダードカーブをもとに標的 DNA に strand transfer した DNA を定量した。

抽出細胞核への PIC のインテグレーション能の測定：HeLa 細胞にバッファー K を処

理し、細胞核の浮遊液を得た。この溶液に PIC を 37°C にて 2 時間反応し、フェノール法にて染色体 DNA を抽出した。この DNA 中の HIV インテグレーション量を下記の方法により PCR 法にて測定した。

リアルタイム PCR (Taqman PCR)：感染細胞よりフェノール法により DNA を抽出し、100ng の DNA をテンプレートとして HIV 特異的プライマーペアにより R/U5 DNA 量, U5/gag DNA 量, 2LTR DNA 量を ABI PRISM 7700 (PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif.) にて定量した。細胞内インテグレーション量の定量には Chun らにより報告されたプライマーを用いた (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:13193-13197, 1997.)。インテグレーションされた HIV DNA の定量のためのスタンダードは MT-4 細胞に HIV ベクター (J. Virol. 72:8150-8157, 1998) を導入して作製した細胞 (MT-4 CS/CG) を確立した。

(倫理面への配慮)

実験に用いる細胞ならびにプラスミドは試験管内にて増殖維持できるものであるため、すべて多くの実験室にて汎用されている。さらにウイルス遺伝子の組み換えとウイルス感染実験を行なうので本大学遺伝子組み換え委員会の承認を得ている。

### C. 研究結果

ウイルス前期課程における DNA 合成：ウイルス感染 1 から 12 時間後までのウイルス DNA 量を測定した。図 1 からウイルス粒子が侵入後、strong DNA の合成は 4 時間後をピークとすること、full-length DNA の合成は 6 から 8 時間後がピークであることがわかった。そして、6 時間後から染色体へのインテグレーションと 2 LTR の合成

がはじまることがわかった。  
PIC の抽出と試験管内インテグレーション能：図 1 に示すように多くの full-length DNA が合成されており、またインテグレーションはまだ始まったばかりであり、インテグレーションされる前駆体である PIC がもっとも蓄積されているのは感染後 6 時間目と考え細胞から PIC を抽出した。そして、今回開発した PIC の試験管内インテグレーションアッセイを行なった (図 2 a)。このアッセイによりインテグレーション能のあるウイルス DNA 量はその時点における full-length DNA 量と比較することにより細胞内に合成された DNA あたり、どのような効率で PIC を形成しているか判明する。結果は図 2b に示すように二回の実験から full-length DNA 量のうちわずか 0.5 から 1.1% が PIC を形成してインテグレーション能があることがわかった。

PIC の抽出細胞核へのインテグレーション能：PIC は細胞質にて形成されるが、その標的である染色体は核内にある。この PIC の核膜を通過して、染色体 DNA へインテグレーションする過程を試験管内において再現するために、ジギトニン処理により細胞質を除き細胞核を抽出し、そこに PIC を添加し、どのような効率で核内染色体へインテグレーションしうるか測定する実験法を開発した (図 3 a)。染色体へのインテグレーション能は昨年開発したインテグレーションを定量しうる PCR 法を行なった。このアッセイは PIC の核膜通過過程とインテグレーション過程を同時に再現するものとする。図 3 b はその結果であり、核膜孔に非特異的に結合する wheat germ agglutinin (WGA) と HIV に対するポリ

クローナル抗体は完全に阻害することよりこのアッセイの特異性は確認された。そして、HIV に感染していない T 細胞である MT-4 細胞抽出液を添加すると活性は増強することが判明し、細胞成分がウイルス前期課程に補助的に働いていることが暗示された。図 3 b の下の数は試験管内インテグレーション能として活性のある PIC あたり、どれだけの割合がこの抽出細胞核内に移行し、インテグレーションしうるか示している。結果は機能のある PIC のうち最大 12.6% のみが核内に移行し、染色体へインテグレーションするとわかった。

#### D. 考察

これらの結果を考察すると HIV 感染前期過程におけるそれぞれの効率がわかってきた。図 4 に示すように、細胞内に侵入後インテグレーション能を有する PIC として形成されるのはおよそ 1% であり、さらに核膜を越えて、染色体 DNA にインテグレーションする機能がある PIC は、その細胞質中のインテグレーション能のある PIC のうち、さらにわずか 10% 前後であることがわかった (図 4)。

すなわち、HIV DNA 合成後のウイルス遺伝子から PIC という複合物の形成能、さらに核膜を越えて最終的にインテグレーションする効率は極めて少ないことがわかった。すなわち、HIV が侵入後のウイルス DNA の移動は考えられているものより、はるかに効率が悪いものであることがわかった。すなわち、前期過程において Abortive infection が頻発していることが想像できる。この前期課程における非効率性は、ウイルス阻害を考えると非常に有利であると考えられる。

さらに今回我々が開発した前期課程効率の正確な把握法により、この過程に関与するウイルス因子の発見ばかりでなく、細胞側因子の検索とそのメカニズムの解明に有益であると考える。

#### E 結論

ウイルス前期課程において PIC 形成と核内染色体へのインテグレーションは非常に効率が悪いことが分かった。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ① Kusagawa, S., Takebe Y, Yang R, Motomura K, Ampofo W, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Ishikawa K, Sata T, Nagai Y, Tatsumi M. Isolation and characterization of full-length molecular DNA clones of Ghanaian HIV-1 intersubtype A/G recombinant (CRF02\_AG) which is replication-competent in restricted host-range. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 17, 7, 649-655, 2001.
- ② Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. Critical contribution of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to apoptosis of human CD4<sup>+</sup> T cells in HIV-1-infected hu-PBL-NOD-SCID mice. *J. Exp. Med.* 193, 651-659, 2001.
- ③ Takahashi Y, Tanaka Y, Yamashita A, Koyanagi Y, Nakamura M, Yamamoto N. OX40 stimulation by gp34/OX40 ligand enhances productive HIV-1 infection. *J. Virol.* 75, 6748-6757, 2001.

- ④ Takahashi K, Baba S, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Kawai G. Two basic regions of NCp7 are sufficient for conformational conversion of HIV-1 dimerization initiation site from kissing-loop dimer to extended-duplex dimer. *J. Biol. Chem.*, 276, 31274-31278, 2001.

- ⑤ Ishikawa K, Janssens W, Banor JS, Shinno T, Piedate J, Sata T, Ampofo WK, Brandful J, Koyanagi Y, Yamamoto N, Canas-Ferreira WA, Adu-Sarkodie Y, and Kurata T. Genetic Analysis of HIV Type 2 from Ghana and Guinea-Bissau, West Africa. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1661-1663, 2001.

##### 2. 学会発表

- ① Miura Y, Misawa N, Maeda N, Inagaki Y, Tanaka Y, Ito M, Kayagaki N, Yamamoto N, Yagita H, Mizusawa H, Koyanagi Y. An animal model for quantification of apoptosis with HIV-1 infection. Cold Spring Harbor, 2001.
- ② 三浦義治、三沢尚子、山本直樹、水澤英洋、小柳義夫. HIV 感染個体内における神経細胞死. 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001.
- ③ 武内寛明、鈴木陽一、山本直樹、小柳義夫. 急性感染患者から分離された T 細胞指向性 HIV-1 遺伝子変異の解析、第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001.
- ④ 蝦名博貴、小柳義夫. HIV preintegration complex の核内移行からインテグレーションまでの分子メカニズムの解析. 第 49 回日本ウイルス学会、大阪、2001.
- ⑤ 小柳義夫、三浦義治、山本直樹、水澤英洋、八木田秀雄. エイズ脳症モデルマウ

- スの確立と神経細胞死のシグナルの解明. 第 15 回日本エイズ学会、東京、2001.
- ⑥ 稲垣好雄、三浦義治、小柳義夫、山岡昇司、山本直樹. EGFP 発現 HIV-1 molecular clone の応用について. 第 15 回日本エイズ学会、東京、2001.
- ⑦ 武内寛明、鈴木陽一、蝦名博貴、巽正志、山本直樹、小柳義夫. マクロファージ前駆体細胞である単球への HIV-1 の感染. 第 15 回日本エイズ学会、東京、2001.
- ⑧ 山本直樹、横山成、田中勇悦、田中礼子、広瀬国孝、谷中幹郎、黒崎直子、高久洋、小柳義夫、市山浩二. A duodenally absorbable CXCR4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity in vivo and in vitro. 第 15 回日本エイズ学会、東京、2001.
- ⑨ 小柳義夫、三浦義治、水澤英洋、八木田秀雄. HIV 感染モデルマウスにおける神経細胞のアポトーシス. 第 31 回日本免疫学会、大阪、2001.
- ⑩ 伊藤守、小林喜美男、川端まりこ、日置恭司、鈴江一友、小柳義夫、菅村和夫、平松英文、平家俊男、中畑龍俊、上山義人. 新たに開発した NOD/Shi-scid,  $\gamma$  c null マウスの移入ヒト細胞の高生着性とその免疫学的特性について. 大阪、2001.

H. 知的所有権の出願、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1. 感染後HIV DNAの合成

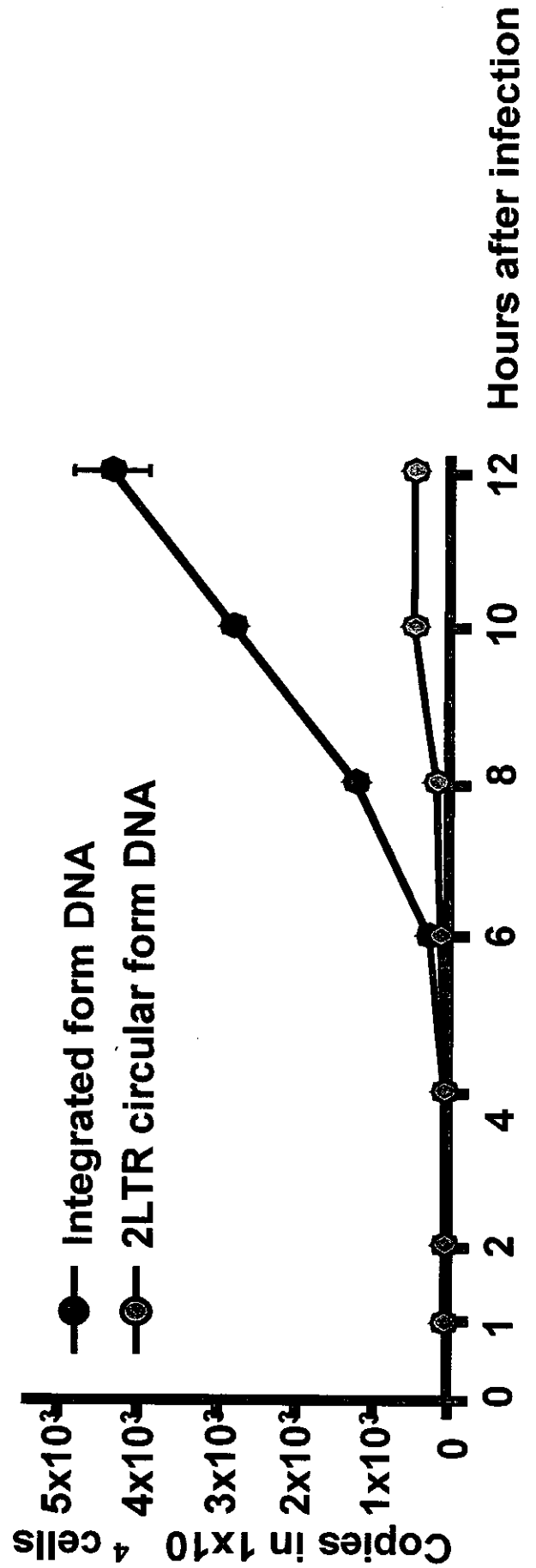
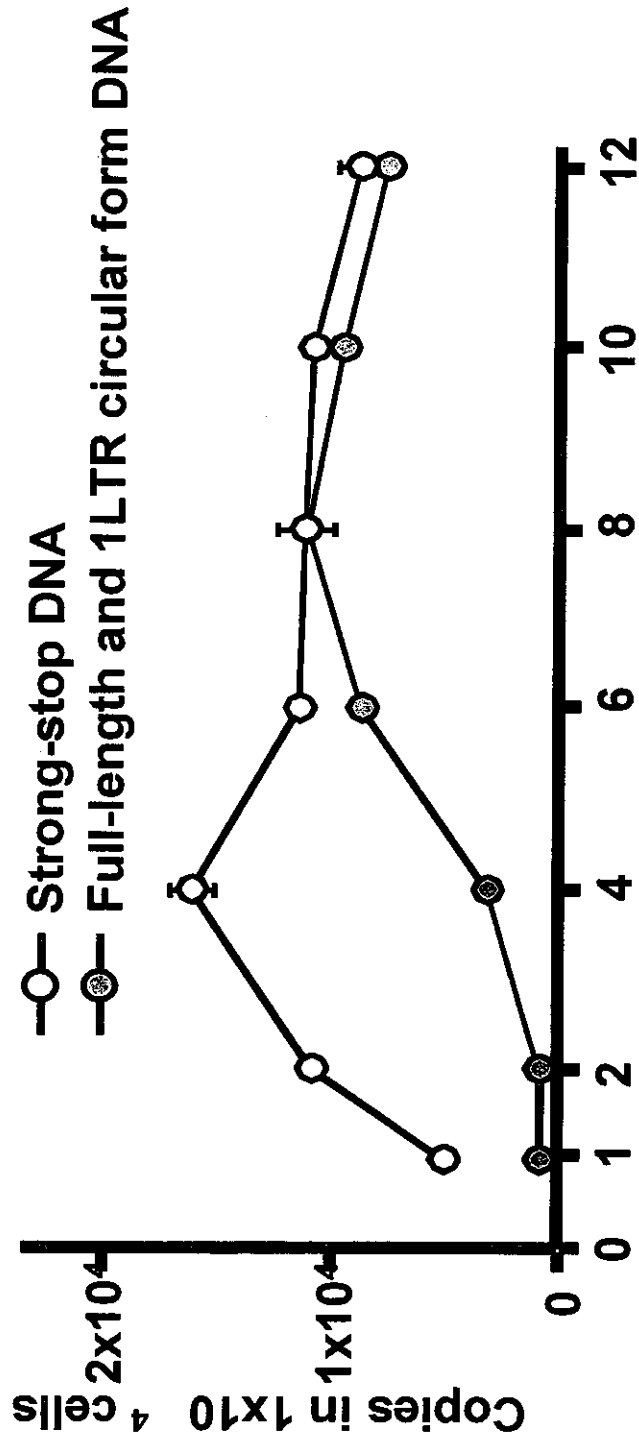


図2a. PICの試験管内インテグレーションアッセイの概略

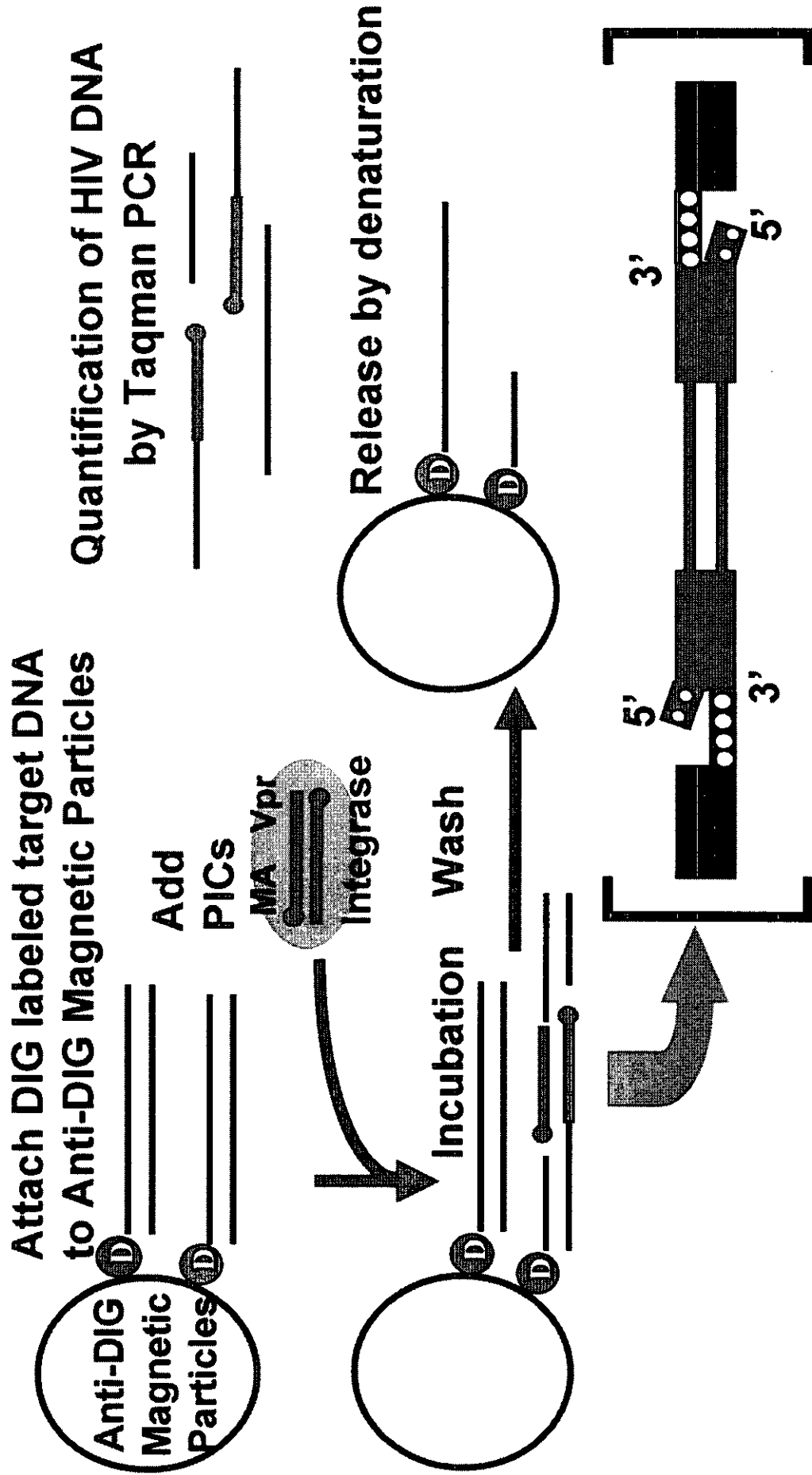


図2b. PICの試験管内インテグレーションアッセイ結果

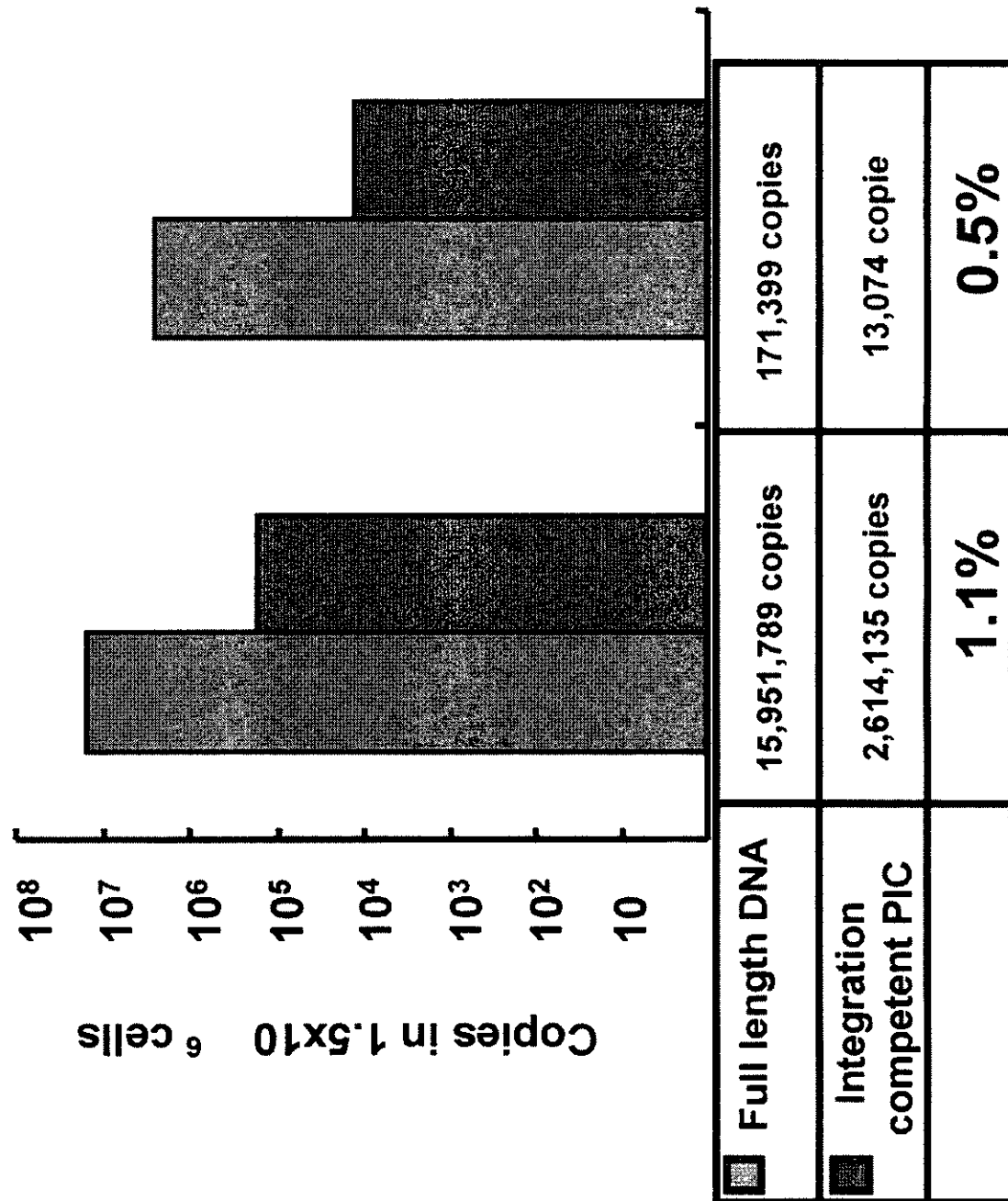


図3a. 抽出細胞核へのPICのインテグレーション能の測定の概略

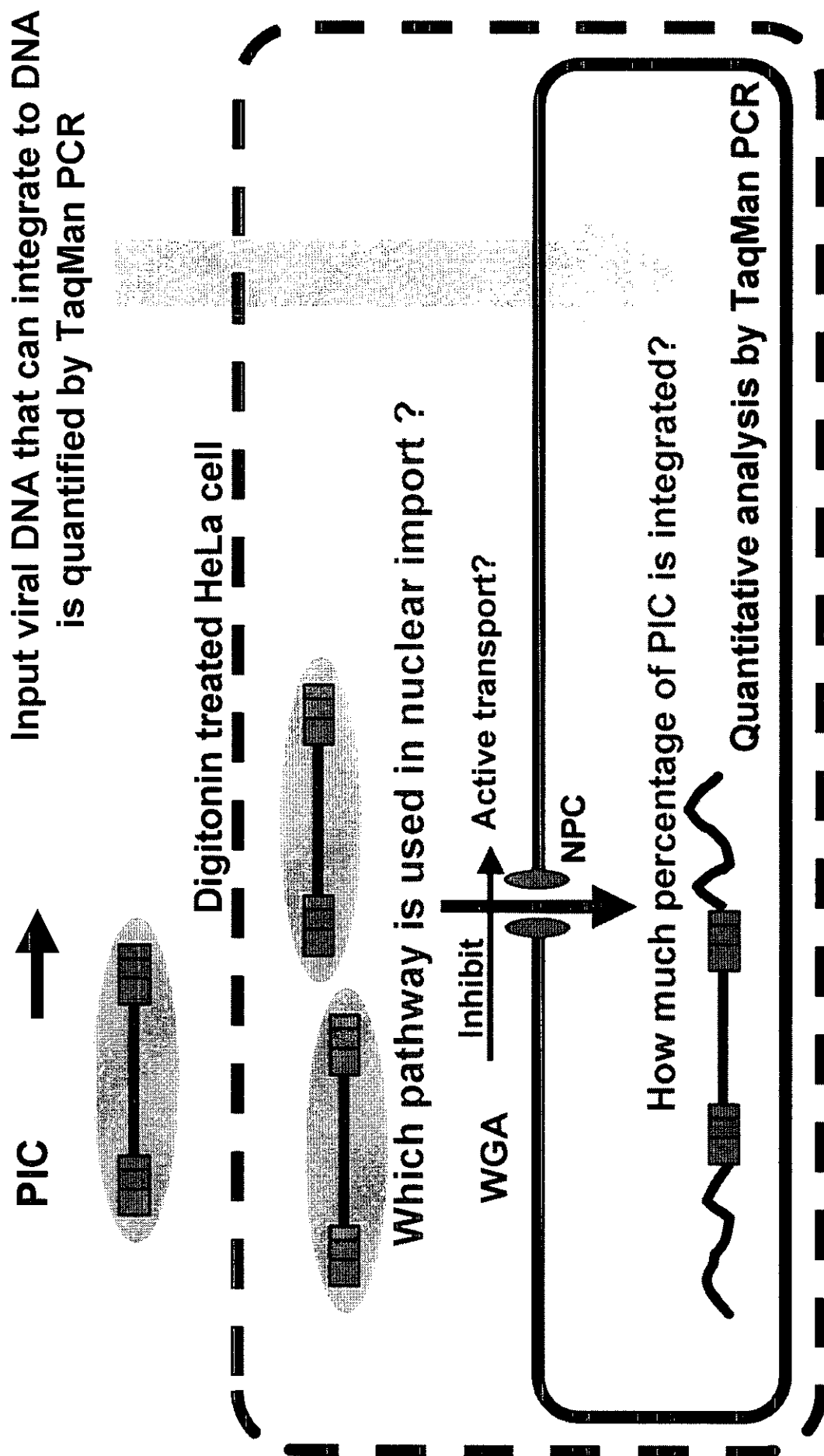




図3b. 抽出細胞核へのPICのインテグレーション能の測定

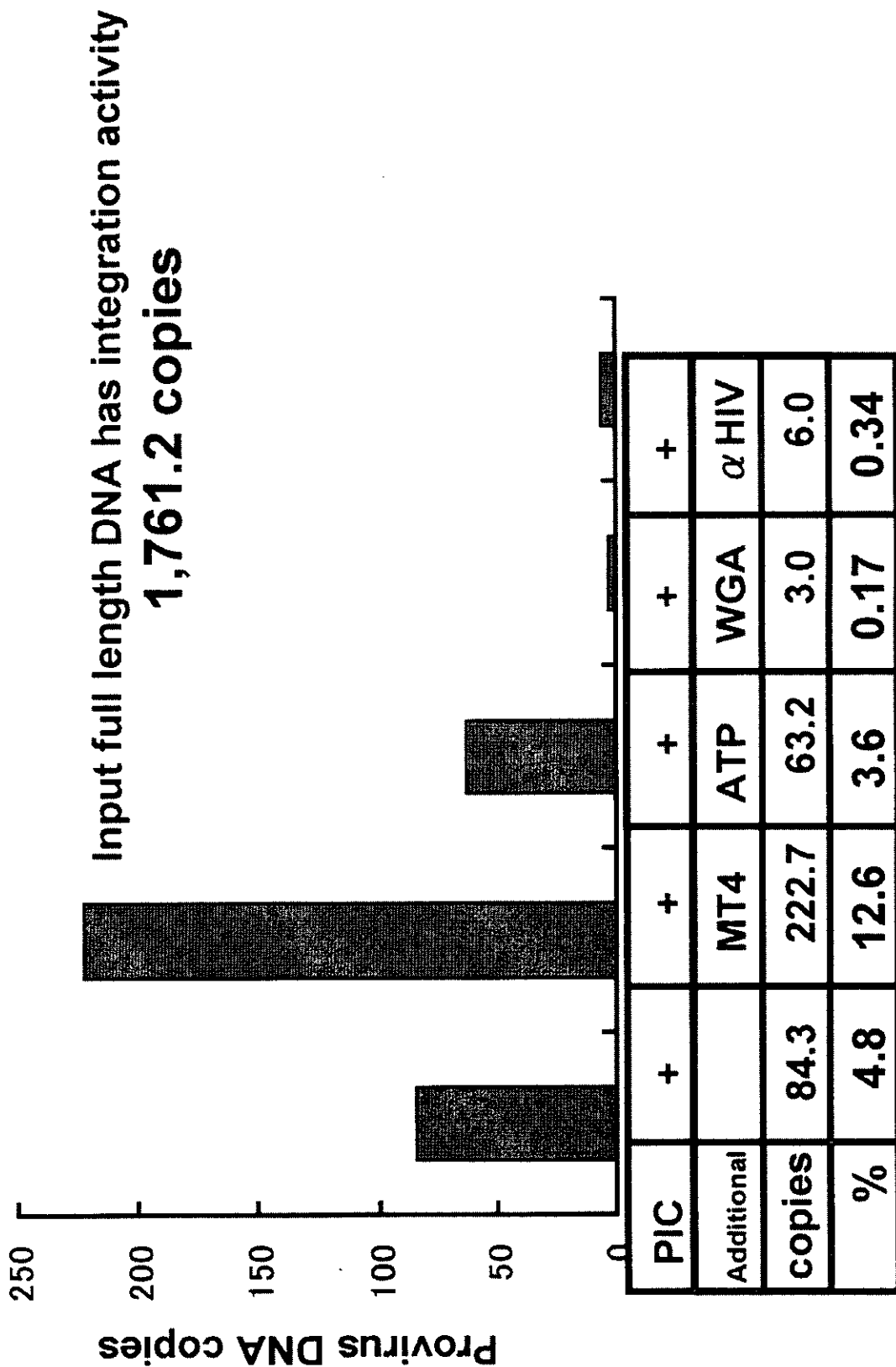
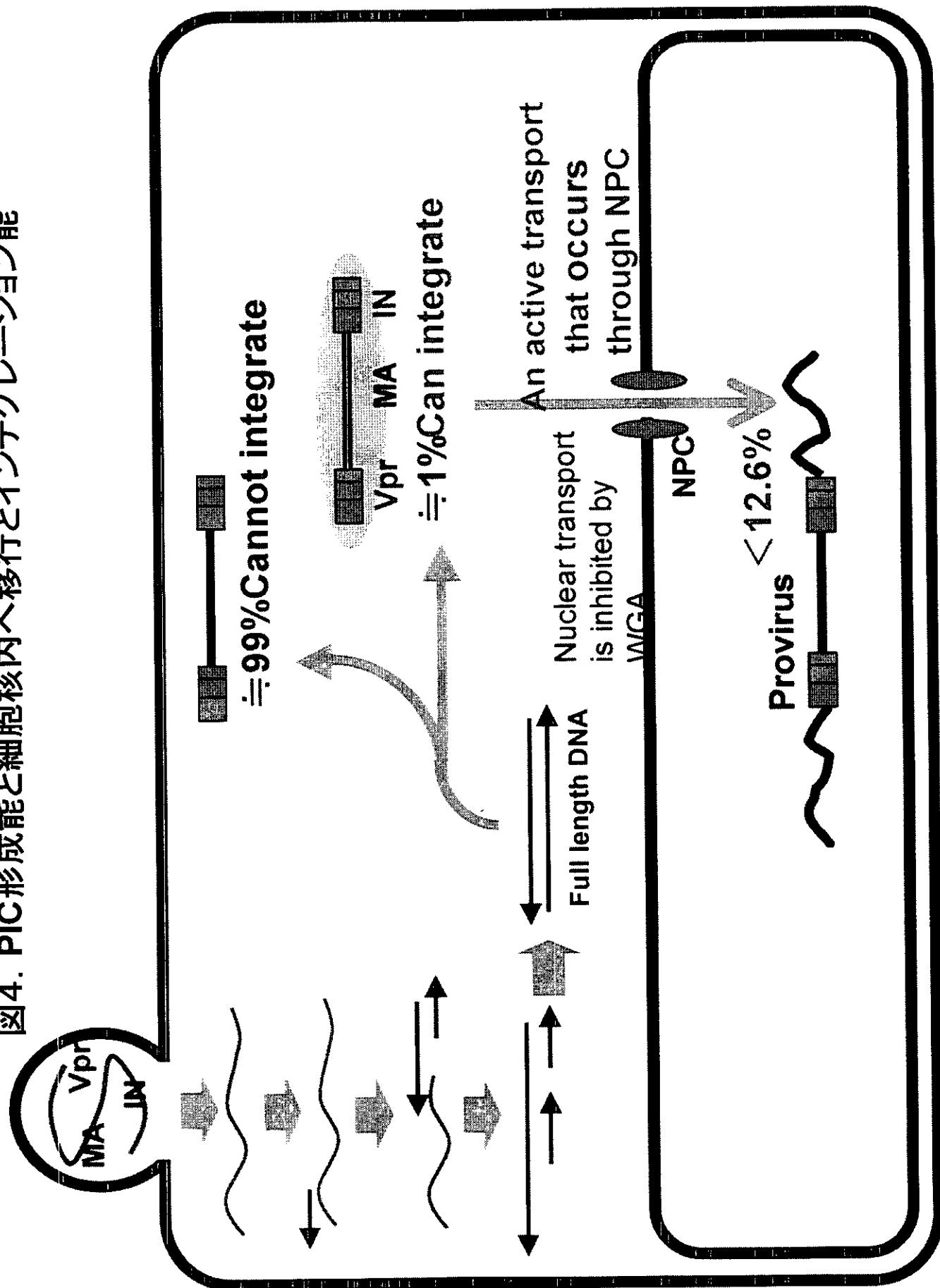


図4. PIC形成能と細胞核内へ移行とインテグレーション能



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

「VPR 測定法の確立と VPR を標的とした抗 HIV 薬の開発」に関する研究  
分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所

HIV アクセサリー遺伝子産物 VPR の測定系の確立と機能解析に基づいた新規抗 VPR 因子探索を行った。VPR の 3 カ所のペプチド抗体を作成し、サンドウィッチ法の確立を試みた。その結果、N-末側及び C-末側ペプチドに対する抗体を用いたシステムが Native form の VPR を検出した。また VPR が Cyclin B に結合し、Cdc2 の活性を上昇させること、VPR による細胞周期異常には HSP70 の機能が必須であることを明らかにした。平成 14 年度では、高感度 VPR 測定系により、患者検体中の VPR 測定を試みる一方、抗 VPR 因子探索を行う。

#### A. 研究目的

VPR は細胞培養液中に添加されると、潜伏感染細胞からのウイルス産生や、神経細胞に対してアポトーシスを誘導することが知られている。また、患者血清や脳脊髄液中に VPR が存在することも見出されており、生体における VPR の重要な役割が推測される。しかし生体内での VPR 濃度や、実際のウイルス産生における関与の有無については不明である。一方、HAART によりエイズ症例の予後が著明に改善したものの、生体からのウイルス駆除には必ずしも貢献できないとする報告もなされ、新しい戦略に基づいた新規抗エイズ療法開発の重要性も示唆される。本研究では、HIV アクセサリー遺伝子 VPR に着目して、本遺伝子産物に対する測定系を確立する一方、抗 VPR 因子探索を行い、エイズ病態での VPR の役割を明らかにするとともに、エイズ発症阻止に貢献し得る薬剤の開発を試みる。

#### B. 研究方法

VPR の異なる 3 つの部位に対するペプチド抗体を作成し、サンドウィッチ法による VPR 検出系の確立を試みた。一方、VPR により誘導される細胞周期異常と HIV-LTR 転写活性亢進の関連性について、我々が樹立した MIT-23 細胞を用いて解析する。

（倫理面への配慮）

本年度は、ヒト検体は使用しなかった。

#### C. 研究結果

1. VPR のアミノ酸 19-37 (N1)、42-60(M1) 及び 80-96 (C1) の 3 カ所のペプチドを用いた抗体作成の試みにより、N1 及び C1 の部位に対する家兎抗体が得られた。
2. これらの抗体は化学合成した 96 アミノ酸からなるペプチドに対しても、良く反応した。
3. サンドウィッチ法による標準サンプルの測定により、現在 30 ng/ml までの VPR を測定することが可能になった。
4. 本システムにより Vpr 遺伝子を導入発現させた細胞の抽出液中に Native form の VPR を検出した。  
さらに、VPR の機能解析に基づいた抗 VPR 因子の探索を試み、VPR による HIV-LTR 活性誘導について、以下の知見を得た。即ち、
5. VPR が細胞周期異常を誘発するための宿主側因子として報告されている Cdc2/Cyclin B (以下 MPF) の活性を上昇させること、
6. VPR は Cyclin B と複合体を形成すること。
7. VPR の Cyclin B への結合には RXXL モチーフを介していること。
8. VPR による MPF の活性化は、RXXL モチーフからなるペプチドにより抑制されること。
9. VPR 発現により、NF- $\kappa$ B の核内移行が認められ、その際 I- $\kappa$ B のリン酸化が誘導されること。

また、VPR による細胞周期異常については、Heat shock protein70 が関与していることを見出した。即ち、

10. VPR が HSP70 の C-末領域に存在する EEVD モチーフに結合すること。
11. VPR が HSP70 に結合することにより、ATPase 活性を上昇させること。
12. VPR との結合には HSP70 の C-末に存在する EEVD モチーフが重要である。

#### D. 考察

VPR による細胞周期異常と HIV-LTR 転写活性誘導の間には密接な関連性があり、少なくとも MPF と HSP70 の 2 者が深く関与していることが示唆された。現在これら 2 種の蛋白質と VPR との結合様式とその生物学的意義についての解析が進行中であり、平成 14 年度中に全貌を明らかにすることができると考えている。一方、VPR が MPF 及び HSP70 に結合する際、それぞれ、RXXL 及び EEVD モチーフが重要である知見を得た。それぞれのペプチドと VPR による固相法を継続して使用し、VPR 機能阻害因子の探索を行う。一方、VPR 測定法の感度及び精度をさらに改善し、臨床応用に耐え得るシステムを構築したいと考えている。

#### E. 結論

1. VPR 機能に HSP70 及び MPF が関与していることを見出した。
2. サンドウィッチ法による VPR 測定の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

1. 論文発表
1. Mishima, T., Yuko Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.: Resistance mechanisms of CD13/Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. J. Natl.

Cancer Inst., in press.

2. Mori M., Terui, Y., Tanaka, M., Ymizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K. Antitumor effect of b2-microglubulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor-kB. Cancer Res., 61, 4414-4417, 2001.
3. Shimura, M., and Ishizaka, Y., Inhibition by quercetin of micronuclei formation via VPR, an accessory gene of HIV. Recent Res, Devel. Cancer 3, 1-5, 2001.
2. 学会発表
1. Kotani, S., Shimura, M., Tanaka, H., Yasuda, H., Ishizaka, Y. : Binding to D-box Motif by Vpr, an Accessory Gene of Human Immunodeficiency Virus, Leading to Perturbation of APC Activities with Delayed Mitosis and Precocious Sister Chromatid Separation. Cell cycle meeting, 2001 May, Salk, USA.
2. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常 第 60 回日本癌学会総会. 2001 年 10 月、横浜.
3. 田口 崇、志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr に相同性を示す蛋白質の同定. 第 24 回日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月、横浜.
4. 溝口 出、志村まり、大沢宣明、石坂幸人: RET 結合ペプチド (RBP-1) を用いた RET 発現細胞への選択的遺伝子導入 第 24 回日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月、横浜.
5. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常 第 24 回日本分子生物学会年会. 2001 年 12 月、横浜.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 無
2. 実用新案登録 無
3. その他 無

# ウイルス感染に伴う宿主細胞遺伝子発現の変化

分担研究者 渡辺 慎哉 東京大学・医科学研究所・助手

**研究要旨** ヒト既知遺伝子 12,000 からなる合成 DNA マイクロアレイを作製し、ヒトサイトメガロウイルス感染にともなう宿主細胞応答を網羅的遺伝子発現プロファイルとして解析した。取得したプロファイルを集積してクラスタ解析を行い、HCMV 粒子の細胞への結合・侵入が急速な宿主細胞応答をひき起こし、細胞外に放出される種々の宿主因子の遺伝子発現が上昇すること、さらにそれらの宿主反応はウイルス遺伝子の発現に従属して低下することを明らかにした。さらに、作製した合成 DNA マイクロアレイを大量に使用して HIV 感染後長期未発症例の末梢血単核細胞由来試料のトランスクリプトーム解析を行い、エイズ発症の遅延に関与する宿主因子遺伝子の同定を最終目標とする長期未発症群と発症群で発現レベルに差がある遺伝子群の同定作業を開始した。

## A. 研究目的

1. 平成 13 年度内にヒト遺伝子 12,000 からなる合成 DNA マイクロアレイを作製し、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染各種細胞から得たサンプルをハイブリダイズさせ、感染経過を追って各時点のヒト遺伝子の発現レベルを調べる。その結果をもとに、HCMV 感染にともなう宿主側の細胞応答を網羅的に解析し、ウイルス感染に対するトランスクリプトーム解析の先駆的モデルを提出する。
2. 本研究班 照沼 裕 班員と共同し、作製した合成 DNA マイクロアレイを大量に使用して HIV 感染後長期未発症例の末梢血単核細胞由来試料のトランスクリプトーム解析を行い、発症の遅延に関与する宿主因子遺伝子の同定を目指す。
3. 本研究の最大の特色は独自に改良・開発し

た技術を用いて自作の合成 DNA マイクロアレイを用いるところにある。この技術を用いれば、マイクロアレイ化する遺伝子を自由自在に選定、遺伝子数を容易に増加、低コストで大量のアレイを作製できる。渡辺班員は平成 13 年までに合成 DNA マイクロアレイ技術に関する 5 件の特許申請を行った。これらの出願特許をもとに大量のマイクロアレイを作製し、可能な限り数多くの細胞に対する細胞応答を明らかにすることにより、各種細胞に特異的な遺伝子発現を同定することが可能となる。これらに関する遺伝子がウイルス感染を規定する宿主側因子であり、宿主-寄生体関係を解明する糸口を提供すると期待できる。

4. 最終的に、本研究は、HIV およびエイズの主要な日和見感染病原体である HCMV の宿主-寄生体関係を明らかにして、エイズ発症機構

の解明を目指すとともに、エイズの発症阻止・遅延因子を明らかにすることにより、すでに HIV に感染してしまった多くの患者の発症をできるかぎり阻止することを目標とする。

## B. 研究方法

### 1. 合成 DNA マイクロアレイの大量作製

平成 12 年度中にすでに作製したヒト遺伝子 5,000 からなる合成 DNA マイクロアレイに、新たに 7,000 種類のヒト遺伝子を追加した。遺伝子選定に際しては、既知遺伝子 (Genbank の RefSeq データベース) を優先させた。

### 2. HCMV 感染細胞からのサンプルの調製

HCMV 感染を許容するヒト正常線維芽細胞に野性株 HCMV を感染させ、4・8・24・48・72 時間後に感染細胞 mRNA を抽出した。また、UV 照射により不活性化した野性株 HCMV を感染させ、同様に感染細胞 mRNA を抽出した。さらに、UV 不活化および非不活化ウイルスを感染後 24 時間の培養細胞上清を回収し、低速遠心、超遠心、およびフィルタ処理によってウイルス粒子を除去した。この培養上清でヒト正常線維芽細胞を 24 時間培養後、細胞 mRNA を抽出した

### 3. HIV 感染者および非感染者からのサンプル調製

HIV 感染者および非感染者の末梢血から単核細胞を分画し、IL-2 存在下で培養後、細胞数が約  $1 \times 10^8$  に達したところで回収し、mRNA を抽出した。

### 4. マイクロアレイハイブリダイゼーション

各種細胞から抽出した mRNA を用いて逆転写反応を行い、蛍光色素 Cyanine-5 を取り込ませた cDNA を調製した。また、レファレンスとして CMV 非感染の正常線維芽細胞および Jurkat 細胞から抽出した mRNA を用いて

Cyanine-3 を取り込ませた cDNA を調製した。各サンプルとレファレンスを等量混合し、マイクロアレイとハイブリダイズさせ、各遺伝子の発現レベルを測定した。

## 5. トランスクリプトーム解析

各種細胞・各タイムポイントで得られたデータを集積し、発現レベルをパターン化した。変動する遺伝子を発現レベルパタンの近いものからで分類・並べ変えることにより同一群とした。各種細胞内でおきている現象を遺伝子発現レベルを共通かつ唯一の指標として記述した。

### (倫理面への配慮)

HCMV 感染による細胞応答の研究には培養細胞レベルでの実験で十分であるため、倫理面での配慮を特段に行う必要がない。一方、HIV 感染後未発症例のトランスクリプトーム解析に関しては、本研究班 照沼 裕 班員が以下の倫理面での配慮を行った。平成 13 年三省合同 (文部科学省・厚生労働省・経済産業省) 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、12 年度倫理審査委員会を受けた研究計画の審査・承認に加え、三省合同基準を満たすように変更を加えて再承認を得た。また、患者主治医の所属施設の倫理委員会での審査・承認、その所属施設長からの研究協力許可書、主治医からの研究協力承諾書を得た。さらに、患者への文書と口頭で研究内容を説明し、研究協力を了解してくれた方から同意書に署名を得た。

## C. 研究結果

### 1. 合成 DNA マイクロアレイの作製

本年度の研究計画に従い、平成 13 年 7 月までに human RefSeq 9,600 遺伝子、平成 14 年 1 月までに human RefSeq 12,000 遺伝子からな

る合成 DNA マイクロアレイの作製を完了した。合成 DNA マイクロアレイに特化したハイブリダイゼーションにおいてシグナル・ノイズ比を極大化する装置を開発し、特許出願した(特願 2001-323412; スライドガラスハイブリダイゼーションチャンバ)。

## 2. HCMV の感染に対する宿主細胞応答のトランスクリプトーム解析

HCMV および UV 不活化 HCMV 感染後のヒト正常線維芽細胞から mRNA を抽出し、作製した合成 DNA マイクロアレイとハイブリダイズさせ、遺伝子発現プロファイルを取得した。さらに、HCMV および UV 不活化 HCMV 感染後 24 時間の培養上清からウイルス粒子を除いたものを培地として 24 時間培養した正常線維芽細胞から同様にして遺伝子発現プロファイルを得た。これらのプロファイルを集積してクラスタ解析を行い、HCMV 粒子の細胞への結合・侵入が急速な宿主細胞応答をひき起こし、細胞外に放出される種々の宿主因子の遺伝子発現が上昇すること、さらにそれらの宿主反応はウイルス遺伝子の発現に従属して低下することを明らかにした。

## 3. HIV 感染後長期未発症例のトランスクリプトーム解析

本研究班 照沼 班員との共同研究として、HIV 感染後長期未発症例における発症抑制因子の特定をめざし、末梢血由来の培養単核細胞の遺伝子発現プロファイリングを開始した。まず、HIV 感染 AIDS 発症例および健常人から培養単核細胞 45 検体を取得し、Jurkat 細胞を共通対照として 9,600 の遺伝子発現レベルを解析した。この 45 検体の内訳は次の通りであった。

### (1) 抗CD3抗体で刺激増殖させたT細胞

- ① HIV感染者の11人19検体

- ② HIV未感染健常人の11人15検体

### (2) PHAで刺激増殖させたT細胞

- ① HIV感染者の6人8検体

- ② HIV未感染健常人の3人3検体

さらに、12,000 遺伝子アレイを用いて長期未発症例 2 検体を含む新たな 17 検体から遺伝子発現プロファイルの取得を完了し、現在解析を行っている。

## D. 考察

1. HCMV 粒子の許容細胞表面への結合あるいは細胞内への侵入を契機として主として炎症に関与する多くの宿主遺伝子が発現され、ウイルス遺伝子の発現および複製サイクルの始動がない場合はそれらの高発現レベルが維持されることから、これらの宿主反応を抑制できるかどうか HCMV の許容性決定のひとつの指標となるのではないかと考える。

2. HIV 感染後長期未発症例のトランスクリプトーム解析において、本報告書作成時点においてデータを取得した 52 検体中わずかに 2 検体が長期未発症例由来であり、発症例との比較は困難である。長期未発症例に特異的な発現レベルを供する遺伝子群の特定には、検体数をできる限り多くすることが必要である。平成 14 年度の前半には、日本に存在する HIV 感染後長期未発症血友病患者の大部分の協力を得られることになっており、アレイ化する遺伝子数をさらに多くすることとあいまって、網羅する範囲をさらに広くできるものと考えられる。

## E. 結論

HCMV 粒子の細胞への結合・侵入は急速かつ激しい宿主細胞応答をひき起こし、細胞外に放出される種々の宿主因子遺伝子の発現が上昇

する。さらにこれらの宿主反応はウイルス遺伝子の発現に従属して低下する。すなわち、HCMV 遺伝子の発現により、それに先立っておきる宿主側の応答が抑制される。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, Watanabe S, Tanigami A, Sugano S. CREB-II: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. Nucleic Acids Res.15;29(10): 2154-62. 2001.

##### 2. 学会発表

(1) 渡辺慎哉 合成 DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析

第 74 回日本生化学会大会

(2) 渡辺慎哉 ヒトサイトメガロウイルスによる宿主細胞応答の抑制

第 49 回日本ウイルス学会学術集会・総会

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

出願番号： 特願 2001-323412

発明の名称： スライドガラスハイブリダイゼーションチャンバ



厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業

「エイズ発症阻止に関する研究」班 平成13年度 分担研究報告書

「エピジェネティックな変化と HIV の潜伏感染・再活性化に関する研究」

分担研究者 渡邊 俊樹 東京大学医科学研究所 助教授

研究要旨：HIV に対する多剤併用化学療法は HIV の潜伏感染している reservoir pool に対しては無効である。そこで、HIV の排除を目的とする治療法の基盤を明らかにすることを目的に HIV の潜伏と再活性化の機構を明らかにすることを目指した。本研究では昨年引き続き、シグナルおよび細胞周期依存的に再活性化する際に特異的に CpG 脱メチル化が認められる CREB/ATF site に特異的に結合する DNA 結合タンパク質の同定・クローニングと機能解析を目指している。更に、我々が新たに見出した、非メチル化 HIV プロウイルスをもつ潜伏感染細胞を用いて、メチル化非依存的な潜伏機構についてヒストン修飾を介したクロマチン構造制御の観点から解析を行った。

#### A. 研究目的：

HIV 感染の治療に多剤併用療法が導入され複製ウイルスロードの減少は可能となったが、生体内に残存する潜伏感染細胞の除去方法は未だに開発されていない。一方、DNA 上の CpG のメチル化が遺伝子の発現制御に関与し、ウイルス遺伝子の CpG メチル化による発現抑制はゲノム防御機構の一つと考えられている。我々は、HIV も LTR の CpG のメチル化により遺伝子の発現が抑制されること、細胞外刺激によるウイルス遺伝子の再活性化と LTR 上の CpG サイトの脱メチル化が相関することを見出した。一方最近では、CpG メチル化を介さないレトロウイルスの発現制御機構が注目されている。そこで、本研究では細胞外シグナルによる HIV 再活性化における CpG の脱メチル化機構を解明すること、およびメチル化を介さない HIV 発現抑制機構をヒストン修飾によるクロマチン構造制御の観点から明らか

かにすることを目指す。

#### B. 研究方法

慢性持続感染細胞株 ACH2 を材料に、TNF- $\alpha$  による刺激を加え、HIV の再活性化を誘導し、抽出した染色体 DNA を bisulfite genomic sequence 法を用いて CpG の脱メチル化部位を解析した。更に脱メチル化部位を含む塩基配列の oligo プローブと抗体を用いた Electrophoresis mobility shift analysis (EMSA) および super-shift assay にて結合タンパク質の解析を行った。さらに、この oligomer を用いた DNA カラムを作製し、Jurkat 細胞の核抽出液を材料にして結合タンパク質の精製を行い、SDS-PAGE にて解析した。1 コピーの HIV プロウイルスが組み込まれた OM10.1 細胞を用いて TNF- $\alpha$  による再活性化の time course の解析を行い、同時に種々の抗ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法によって、刺激依存的なクロマチン構造の変化を解析

した。

#### C. 研究結果:

1) HIV トランスジェニックマウスで観察された特異的な CpG サイトの刺激依存的脱メチル化が、ACH2 細胞を TNF- $\alpha$  で刺激して HIV の再活性化を誘導する事により、慢性感染細胞においても同様の制御が見られる事が確認された。2) 特異的脱メチル化部位である CREB/ATF ファミリーの結合配列に結合するタンパク質の DNA カラムを用いた精製を進めた。SDS-PAGE の銀染色によって 5-6 種類の特異的結合タンパク質の存在が確認された。現在 MALDI-TOFF 質量解析によるタンパク質の同定を試みている。3) 潜伏感染細胞 OM10.1 では HIV プロウイルス LTR が全くメチル化を受けていない事が明らかになった。この細胞は、CpG メチル化非依存的潜伏感染のモデルとなりうる事が示された。4) クロマチン免疫沈降法 (ChiPs) で LTR 上のヒストンの修飾状態を解析致した結果、転写開始点近傍のヌクレオソーム B (NucB) と U5 領域の NucC では、非刺激時には H1 の結合と H3 の低アセチル化が認められ、"repressive histone code" に合致する事、TNF- $\alpha$  刺激後は、NucB では H1 の解離と H3 のアセチル化の亢進が認められ、"permissive histone code" への変換が確認されたが NucC 領域ではそのいずれもが認められなかった。さらに、いずれのヌクレオゾームにおいても刺激依存的にメチル化が抑制される事が明らかになった。しかし H3 のリン酸化には明らかな変化は認められなかった。以上の結果は、非メチル化 HIV の潜伏には抑制的ヒストンコードを介したクロマチンの凝集が関与している事を示している。さらに、ヒストン修飾のうち、メチル化が刺激

依存的に制御される事をはじめて明らかにした。

#### D. 考察

本年度の研究においては、以下の 2 点について解析を行った。まず、シグナル及び細胞周期依存的に特異的に脱メチル化する CREB/ATF 結合配列内の CpG site に結合する核内タンパク質については、DNA カラムを用いた精製と MALDI-TOFF 質量解析によるタンパク質の同定は、現在も進行中である。次に、我々が新たに注目した、CpG メチル化を介さない潜伏感染=HIV 発現抑制機構の解析に関しては、ChiPs 法による解析が進み、HIV においても "repressive histone code" の概念が適用出来る事が示された。今後は、制御機構の解析として、repressive code を解除するシグナル伝達系についての解析とシグナル依存的な histone 修飾の変化を明らかにする事を目指して解析を行う予定である。さらに、我々の解析から、生体内における HIV の潜伏感染において、CpG メチル化を介した発現抑制と、ヒストンの修飾を介した CpG メチル化非依存的な発現抑制のどちらの機構が主に関与しているのかが今後の課題として明らかになってきた。この課題を検討するには生体内の感染細胞特に reservoir pool 内の潜伏感染細胞の直接的な解析が必要である。しかし、ひとの HIV 感染者では研究を目的としてリンパ節等のリンパ組織を採取する事は倫理的にも困難である。また、末梢血中のウイルス感染細胞は 10 の 6 乗細胞に 1 個程度の低頻度であり、CpG のメチル化解析および ChiPs によるヒストンの修飾の解析のいずれもが技術的に不可能と言わざるを得ない。従って、本研究によって明らかになった課題を

検討するには感染動物のモデル系を利用する以外に方法はないと考えられる。従って、来年度以降は、この点に関しては、京都大学ウイルス研究所の速水教授らのグループと共同研究を開始しサル感染系による解析を開始する予定である。

HIV のメチル化非依存的発現抑制の制御機構の解析は、ヒストンの修飾制御を介したヌクレオゾーム構造の制御を解析する格好のモデルとなりうる。実際我々は、未だ報告されていないヒストンメチル化の刺激依存的な制御を見出した。OM10.1 の HIV 潜伏・再活性化の系は、現在次々と同定されその機能が注目されている histone methylase の機能性御を解析する上で重要な系となる可能性がある。

#### E. 結論

シグナル依存的に特異的脱メチル化を示す部位への結合タンパク質の解析は、Dnmt1 の結合阻害を介して脱メチル化部位を指定しそれを制御する新たな機能分子の同定につながる可能性がある。その機能を明らかにすることは生体内における CpG メチル化制御の分子機構の理解に新たな展開をもたらすと考えられる。一方、メチル化を介さない発現抑制機構に関する本年度研究の結果は、非メチル化 HIV プロウイルスの潜伏感染では、主に Repressive Histone Code を介するクロマチンの制御により、ウイルスの発現が強く抑制されることを示すものである。Repressive Histone Code としてヒストン H3 のメチル化状態は今回の解析により私たちが初めて確認したものであり、今後その機能的意義を明らかにする予定である。今後は、実際に感染者のリザーバーでの潜伏様式はどうなっている

のかを明らかにするため、メチル化の解析法の感度をあげる方法を考慮しつつ（技術的には非常に困難である）、SHIV の実験系から、リンパ節等のプロウイルスのメチル化状態を解析することにより、感染者の生体内での現象を理解する手がかりを得る事を目指す。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(投稿中)

1, Tanaka J, Ishida T, Yasuda J, Watanabe T, Iwakura Y. Reactivation of HIV-1 in transgenic mice requires cell cycle progression-dependent demethylation of putative CREB/ATF sites. submitted to J Exp Med.

##### 2. 学会発表:

###### 1、国際学会

1-1. 10<sup>th</sup> International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related viruses/ Dublin. "Latent HIV reactivation required the CpG demethylation in LTR region mediated by extracellular signals." Takaomi Ishida, Tsukasa Koiwa, Toshiki Watanabe.

1-2. 2001 Annual Meeting of the Institute of Human Virology, University of Maryland/ Baltimore "Extracellular signal-mediated reactivation of latent HIV requires CpG demethylation in LTR region" Takaomi Ishida, Tsukasa Koiwa, Toshiki Watanabe.

###### 2、国内学会

(1) 第24回日本分子生物学会年会

1-1. 「CpG メチル化を介さない HIV の潜伏化と再

活性化の分子機構の解析」宇佐美（濱野）章子、  
石田尚臣、渡邊俊樹

1-2. 「潜伏 HIV 再活性化時に認められる特異的  
脱メチル化 CpG sites に結合する核内因子の解  
析」石田 尚臣、小岩 司、宇佐美（濱野）章  
子、渡邊 俊樹

（2）第49回ウイルス学会学術集会

「潜伏 HIV 再活性化における LTR の CpG メチル  
化制御」石田尚臣、小岩 司、宇佐美（濱野）

章子、渡邊俊樹

（3）第16回日本エイズ学会学術集会

「HIV 再活性化シグナルによる CpG 脱メチル化  
の意義」石田尚臣、小岩司、渡邊 俊樹

（4）第60回 日本癌学会総会シンポジウム

「がんのエピジェネティクス研究の新展開：  
レトロウイルス発現のエピジェネティックな制  
御」

渡邊俊樹