

平成14年度厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H13-エイズ-002

HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び  
増殖制御に関する研究

総括・分担研究報告書

平成15年3月

主任研究者 佐藤 裕徳

(国立感染症研究所・遺伝子解析室・主任研究官)

## 研究組織

研究者名	分担	所属	役職
佐藤 裕徳	班長	国立感染研・遺伝子解析室	主任研究官
原田 信志	班員	熊本大・医学部・感染防御学	教授
庄司 省三	班員	熊本大・薬学部・生化学	教授
服部 俊夫	班員	東北大・大学院医学系研究科・感染病態学	教授
間 陽子	班員	理化学研・分子ウイルス学研究ユニット	ユニットリーダー
増田 貴夫	班員	東京医科歯科大・大学院医歯学総合研究科・免疫治療学	助教授
岡本 尚	班員	名古屋市立大・大学院医学研究科・細胞分子生物学	教授
増田 道明	班員	獨協医科大・微生物学	教授
足立 昭夫	班員	徳島大・大学院医学研究科・ウイルス病原学	教授
生田 和良	班員	大阪大・微生物病研・ウイルス免疫分野	教授
櫻木 淳一	班員	大阪大・微生物病研・ウイルス感染分野	助手
田代 啓	班員	京都大・遺伝子実験施設・遺伝病解析分野	助教授
横幕 能行	班員	国立感染研・エイズ研究センター	研究官
松田 善衛	班員	国立感染研・エイズ研究センター	室長
仲宗根 正	班員	国立感染研・エイズ研究センター	主任研究官
高橋 秀宗	班員	国立感染研・感染病理部	室長
小島 朝人	班員	国立感染研・感染病理部	室長
巽 正志	班員	国立感染研・獣医科学部	主任研究官
村上 努	研究協力者	琉球大・医学部附属沖縄アジア医学研究センター	助教授
三隅 将吾	研究協力者	熊本大・薬学部・生化学	助教授
明里 宏文	研究協力者	国立感染研・霊長類センター	主任研究官
駒野 淳	研究協力者	国立感染研・エイズ研究センター	研究官
久保 嘉直	研究協力者	長崎大・熱帯医学研・エイズ感染防御分野	助手

## 目次

### I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書..... 1  
主任研究者：佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・遺伝子解析室)

### II. 分担研究報告書

#### 柱1 複製の分子素過程の研究

##### (i) ウイルス分子-細胞分子相互作用

###### -吸着・侵入・細胞質内輸送-

2. HIV-1 の吸着侵入機構と中和機序に関する研究..... 5  
分担研究者：原田 信志 (熊本大学・医学部・感染防御学講座)
3. ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 生活環におけるアクチンの役割に関する研究..... 9  
協力研究者：駒野 淳 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)
4. Env/Gag 蛋白の相互作用と HIV-1 の細胞侵入との関連..... 15  
協力研究者：村上 努  
(琉球大学・医学部附属沖縄アジア医学研究センター・助教授)
5. Gp120 の V3 ループの細胞膜結合部位と 50.69 陽性 gp41 の細胞膜存在様式..... 21  
分担研究者：服部 俊夫 (東北大学・大学院医学系研究科・感染病態学)
6. HIV 侵入の無細胞解析系におけるウイルス感染特異性..... 25  
分担研究者：小島 朝人 (国立感染症研究所・感染病理部)

###### -PIC 核内輸送-

7. HIV-1Vpr と相互作用する細胞内因子の解析..... 27  
分担研究者：間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット)
8. HIV-1 インテグラーゼの新規機能とその関連因子の探索..... 33  
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)

###### -転写制御-

9. HIV プロウイルスからの転写制御：RelA-associated inhibitor (RAI) の HIV 複製抑制機構に関する研究..... 37  
分担研究者：岡本 尚  
(名古屋市立大学・大学院医学研究科・細胞分子生物学)
10. T細胞サブセットと HIV-1 トロピズム..... 41  
分担研究者：生田 和良 (大阪大学・微生物病研究所・ウイルス免疫分野)

###### -細胞周期異常誘導-

11. HIV-1 Vpr による宿主細胞周期のかく乱機構に関する研究..... 45  
分担研究者：増田 道明 (獨協医科大学・微生物学)

###### -蛋白質立体構造形成-

12. SIV Gp120 立体構造形成における糖鎖の役割..... 47  
主任研究者：佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・遺伝子解析室)

ーオリゴマー形成ー

1 3. HIV-1 gp41 膜貫通領域の GXXXG モチーフに関する研究.....	51
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)	
(ii) 調節遺伝子産物の構造と機能	
1 4. HIV アクセサリー蛋白質の機能解析.....	55
分担研究者：足立 昭夫 (徳島大学・大学院医学研究科・ウイルス病原学)	
(iii) プロテオーム解析	
1 5. HIV 粒子のプロテオーム解析.....	59
協力研究者：三隅 将吾 (熊本大学・薬学部・生化学)	
(iv) 吸着・侵入阻止法の開発	
1 6. HIV coreceptor を基礎にした吸着・侵入・増殖制御法の開発.....	65
分担研究者：庄司 省三 (熊本大学・薬学部・生化学)	
1 7. 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.....	71
分担研究者：田代 啓 (京都大学・遺伝子実験施設・遺伝病解析分野)	

柱2 易変異性研究

(i) 逆転写・組み換え制御因子の候補	
1 8. HIV-1 ゲノム RNA の発芽前後における性状変化と宿主因子の解析.....	73
分担研究者：高橋 秀宗 (国立感染症研究所・感染病理部)	
1 9. HIV ゲノムの二量体化に関する研究.....	77
分担研究者：櫻木 淳一 (大阪大学・微生物病研究所・ウイルス感染分野)	
2 0. HIV-1 Vif タンパク質機能の分子機構に関する研究.....	85
協力研究者：明里 宏文 (国立感染症研究所・筑波医学実験用霊長類センター)	
(ii) HIV サブタイプ	
2 1. HIV-1 subtype A 感染性分子クローンの分離とその構造.....	89
分担研究者：巽 正志 (国立感染症研究所・獣医科学部)	
(iii) HIV 蛋白質の変異と進化	
2 2. HIV-1 が特異的 CTL の認識から逃避し増殖する機構の解析 -epitope 領域のアミノ酸変異が CTL の感染細胞の認識に 与える影響について.....	95
分担研究者：横幕 能行 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
2 3. 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.....	101
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)	

III. 業績一覧(2002).....	111
----------------------	-----

# I. 総括研究報告書

# HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究 平成14年度 総括研究報告書

主任研究者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所・主任研究官）

## 研究要旨

2つの研究の柱（複製と易変異性発現の分子素過程研究）を設定し、共通目標として①これらの過程の制御に関与する細胞分子、分子間相互作用、分子修飾の同定、②複製阻害剤の作用点と効果の明確化、③構造生物学的解析手法の適用、を設定した。得られた知見は、ウイルスと細胞の相互作用の理解、易変異性発現過程の理解、新たな予防治療法の開発と改良に資する。

本年度までに、①ウイルス分子と相互作用する、または機能発現に関与する種々の細胞分子（DNA複製制御因子 topoisomerase I、核内輸送制御因子 Rch-1、細胞周期制御因子 WEE1、14-3-3 $\beta$ 、膜蛋白質立体構造形成制御因子 calnexin、calreticulin）の同定、②ウイルス分子の安定性に必要なアミノ酸、ゲノム2量体化シグナルの同定、③プロウイルス転写抑制活性をもつ細胞分子 RAI、複製阻止能を持つ低分子化合物 ONO-4007A の同定、新たな吸着侵入制御法 cDDR5-MAP ワクチンの提案、④統合計算化学システム MOE を有効使用できる人材の育成による立体構造解析の基盤づくり、などの成果を得た。

## 分担研究者（17名）

庄司 省三：熊本大・教授  
原田 信志：熊本大・教授  
服部 俊夫：東北大・教授  
田代 啓：京大・助教授  
間 陽子：理化学研・ユニットリーダー  
増田 貴夫：東京医科歯科大・助教授  
岡本 尚：名古屋市立大・教授  
生田 和良：大阪大・教授  
足立 昭夫：徳島大・教授  
増田 道明：獨協医科大・教授  
櫻木 淳一：大阪大・助手  
松田 善衛：国立感染症研・室長  
横幕 能行：国立感染症研・研究官  
仲宗根 正：国立感染症研・主任研究官  
小島 朝人：国立感染症研・室長  
高橋 秀宗：国立感染症研・室長  
巽 正志：国立感染症研・主任研究官

## 研究協力者（5名）

久保 嘉直：長崎大・助手  
村上 努：琉球大・助教授  
三隅 将吾：熊本大・助教授  
駒野 淳：国立感染症研・研究官  
明里 宏文：国立感染症研・主任研究官

## A. 研究目的

現在4000万人に達する HIV 感染者、急増する新規感染者は、放置すればほぼ確実に死に至る。HIV 感染者の治療法確立は、国内外の厚

生労働行政上の重要課題であり、現時点では薬剤治療が唯一の治療手段である。

現行の薬剤治療の主要な問題点に、耐性獲得が挙げられる。この問題に対処する中長期戦略として、①新たな作用点・様式をもつ抗 HIV 薬の開発、②HIV 易変異性の理解と制御手段の開発、の2点が挙げられる。その実現、およびワクチン等他の手段による予防治療を現実的なものにするには、HIV の複製および易変異性に関する基礎研究基盤の充実が必須であることは論を待たない。

国内の HIV 複製・易変異性研究は、開始後十数年を経て多様化が進む反面、個々の力が分散する傾向にある。本研究班では、高い潜在能力を有しながら総花的傾向が強まっているこれらの基礎研究を、ウイルスの理解と制御に焦点を絞った研究へと転換し、HIV 増殖研究の質と効率の向上を目指す。得られる学術成果は、HIV 感染症の理解、予防治療法の開発と改良、国民の教育と啓蒙に役立てる。

## B. 研究方法

国内の主な HIV 複製・変異研究者を結集し、以下の計画により複製機構と易変異性の理解向上を計る。①研究の柱の設定：HIV 増殖の理解と制御に最も本質的と考えられる2つの基本課題（複製と易変異性発現の分子素過程研究）を設定する。②研究組織：18人の研究者で分担する。抗 HIV 薬開発に直接重要な役割を果たす

複製研究に最も多くの分担研究者（16名）を配置する。治療の最適化に必須と考えられる変異研究については、国内研究基盤が薄いため少人数（2名）で開始し、3年以内に強化に努める。年1回、班の編成内容を見直す。③立体構造研究の推進：増殖研究と阻害剤開発に重要な役割を果たす立体構造研究を予備的に開始する。④萌芽的研究の推進：適宜、主に若手の基礎研究者を協力研究者として募り、研究の機会均等に努める。⑤最新成果の情報収集と班員間の交流推進：シンポジウム、テーマ別ワークショップを開く。⑥研究期間：以上を3年計画で遂行する。13-14年度は準備検討期間、14~当該年度（最終年度）は成果の収穫期と位置付ける。⑦平成15年度終了時まで、学術・臨床研究面での進展が見込まれる分担・協力研究を絞り込む。研究が十分進展したものに関しては、構造解析専門家との共同研究を開始する。

（重点課題）分子生物学、分子遺伝学、細胞生物学、生化学研究に用いられる種々の解析手法を適用し、以下の研究を推進する。

●柱1：複製の分子素過程の研究：①複製に必須の細胞分子装置、分子間相互作用、分子修飾、複製中間複合体を同定する。②成果を複製の理解と制御に資する。

●柱2：易変異性研究：①逆転写反応、およびゲノム組み換えの制御に関与するウイルスおよび細胞要因を同定する。②成果をHIVの易変異性の理解と治療の最適化に資する。

（支援研究）○立体構造研究：①カナダCCG社の統合計算化学システムMOEを導入し、有効使用できる人材を育成する。②HIV変異蛋白質・細胞蛋白質・糖鎖・阻害剤等低分子化合物の立体構造モデル作製、蛋白質と低分子化合物の結合様式解析、などを行い、複製の理解と阻害剤開発に資する。

#### （倫理面への配慮）

規定項目の遵守により、本研究の遂行に倫理面の問題は無いと判断した（研究計画書10、倫理面への配慮の項参照）。

### C. 研究結果

1) 全体：①研究計画の公開、班会議開催などによる研究目的・必要性・目標・計画の明確化、②MOEの導入と関連レジデントの採用・育成による立体構造研究の基盤強化、③米国HIV複製研究者の招聘とシンポジウム開催による増殖研究の最新成果収集と方向性の議論、④研究協力者5名の新規加入による萌芽研究の導入、などを行った。

- 2) 細胞因子：①ゲノムRNAが粒子中で断片化しやすいこと、topoisomerase IがゲノムRNA結合活性と断片化修復活性をもつことを示した（高橋）。逆転写反応や組み換え効率の制御に関与する重要な相互作用かもしれない。②Vprは核内輸送制御因子Rch-1との相互作用を介し核移行活性を発現すること（間）、Rch-1はインテグラーゼ結合活性をもち、HIV感受性細胞で優位に発現していること（増田貴）を示した。マクロファージにおけるプロウイルス核内移行に関与する重要な相互作用かもしれない。③VprによるG2/M arrest誘導にWEE1と14-3-3βが関与することを見出した（増田道）。Vprによる細胞周期異常誘導の理解と制御に重要な知見と考えられる。④Env前駆体と小胞体分子シャペロンcalnexin、calreticulinとの結合を示し、相互作用がEnvの任意の糖鎖を介して結合と遊離を繰り返す動的相互作用に基づく可能性が高いことを示した（佐藤）。高変異性Gp120が蛋白質レベルで立体構造を維持するしくみを明らかにする手がかりとなる。
- 3) ウイルス因子：①Vifの安定的発現とウイルス増殖に必須のアミノ酸残基（E88とW38）を見出した（足立）。②ゲノムRNA2量体化効率を測定する系をつくり、異種HIV-1サブタイプ間で2量体化効率に差があることを見出した（櫻木）。
- 4) 複製抑制因子：①NF-κBとSp1の制御因子RAIを同定し、これにプロウイルス転写阻止能があることを見出した（岡本）。Tat合成前の基本転写の制御に重要な手がかりを与える。②複製阻止能を有する低分子化合物ONO-4007Aを同定し、吸着・侵入過程を阻害する可能性を示した（田代）。③ワクチン候補cDDR5-MAPがサルにおいてR5ウイルス中和抗体を誘導することを示した（庄司）。④CD38-CD4+ T細胞においてX4ウイルスの複製が転写以降の段階で抑制されることを見出し、抑制因子の探索に着手した（生田）。
- 5) 立体構造解析：①逆転写酵素の高度精製系を確立し、基質特異性に関する構造機能関連の解析に着手した（佐藤）。②MOEの各種プログラムを用いて種々のHIV分子変異体（糖鎖付加Gp120、RT p66/p51ヘテロダイマー、プロテアーゼホモダイマー等の分子モデルを作製した。低分子基質のドッキングシュミレーションを行い、計算化学的手法の精度の高さを確認した（佐藤）③

タンパク質立体構造の差異に基づく進化系統樹解析プログラムを作製した(仲宗根)。

- 6) 他の複製・易変異性研究：①抗原提示過程を再現する CTL assay 系をつくり、Gag エピトープ変異が CTL 認識効率の低下をもたらすことを示した。免疫逃避機構および MHC-I/ペプチド複合体形成機構の理解に重要な手がかりを与える(横幕)。②HIV-1の主要流行亜株の感染性分子クローンのセット(A, AG, B, C, E)がそろい、複製・易変異性研究への適用段階に入った(巽、生田、佐藤)。③吸着・侵入の分子過程の理解と制御に重要な多重結合仮説を支持する結果が蓄積された(原田)。③吸着・侵入過程における細胞膜ラフト構造の関与を示唆する結果を得た(服部)。④Gp41 膜貫通部位ヘリックス構造の意義を GXXXG モチーフに着目して検討中(松田)⑤細胞膜依存的に Gag p24 を遊離する in vitro ウイルス侵入系を樹立し、細胞侵入・逆転写反応への影響因子を解析中(小島)。
- 7) 研究協力者：①細胞膜裏打ち構造の制御因子 Ankyrin (久保)、②アクチン新生鎖合成の制御因子 Arp2/3 (駒野)、③Gag-Gp41 細胞質領域の相互作用(村上)が、ウイルスの膜融合・侵入・細胞質内輸送に果たす役割を解析中。④Vif の Gag 前駆体開裂阻止活性(明里)、ウイルス粒子中の Gag p24 ホルミル化と3種の CyclophilinA isoform (三隅)を見出し、集合・侵入・脱殻・逆転写等の制御に果たす役割を解析中。

#### D. 考察

- 1) 進捗状況：①複製の分子素過程の研究＝◎：一部に目標(複製に必須の細胞分子装置や分子間相互作用の同定)に近付く成果が得られた。ただし、複製に必須であるかの確認が十分では無い。②易変異性研究＝○：未開拓領域が多く、今だ特筆すべき成果を得るに至っていない。新たな実験系の確立、逆転写反応・組み換え研究の開始などにより、準備検討段階は予定通り着実に進化した。③立体構造研究＝○：計算化学的手法の導入と検討により、複製・易変異性研究の成果に速やかに対応するための基盤強化は着実に進化した。④全体＝◎：計画を順次実行することにより、焦点を絞った基礎研究への転換、萌芽的研究の推進が着実に進化した。
- 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：①学術的・国際的意義＝◎：

研究成果は、国際的に評価の高い基礎ウイルス学欧文雑誌(J. Virol. 11報, Virology 2報、他多数)に公表された。他に国内外の学術会議における口答発表、総説著作が多数あり、ウイルス学の進展に対する貢献度は大といえる。②社会的意義＝○：特許の出願3件。間接的貢献(予防治療・啓蒙・教育に資する基礎知見の提供)を主とする。地味ではあるがエイズ対策立案の最も基礎となる部分を構築する研究であり、一連のエイズ対策研究への直接・間接的な波及効果は大といえる。

- 3) 今後の展望について：①全体：重点・支援課題に関するテーマ別ワークショップを開催予定。一部の分担研究について計算科学的手法の適用を試みる。15年度終了時までには、X線結晶構造解析の専門家との共同研究開始を予定。②複製研究：RNAi、変異体等を用いた解析により、同定された細胞分子の一部について複製における役割が明確になる予定。③易変異性研究：逆転写酵素の基質特異性、忠実度、組み換え反応など易変異性に関わる生化学的特性と制御因子について新知見が得られる予定。

#### E. 結論

分担研究者・研究協力者の理解と協力により、本研究の計画は順調に進行している。短中期目標として、2つの研究の柱の中から立体構造解析に到達する分担課題の一つでも多く育てることが挙げられる。これにより、中長期的には増殖機構や易変異性の分子レベルでの理解が進み、複製阻害剤や変異発生制御法の論理的な開発が具体化する。

#### F. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)

- 1) 高橋秀宗他3名共同出願『AIDS治療薬のスクリーニング法』平成14年7月出願。
- 2) 高橋秀宗他3名共同出願『ヒトtopoisomerase Iの236, 237番目のグルタミン酸、アスパラギン(236Glu, 237Asn)を標的としたAIDS治療』平成14年8月出願。
- 3) 間陽子 理化学研究所共同出願『カスパルゼ9活性化剤』平成14年8月2日出願。

#### G. 研究発表

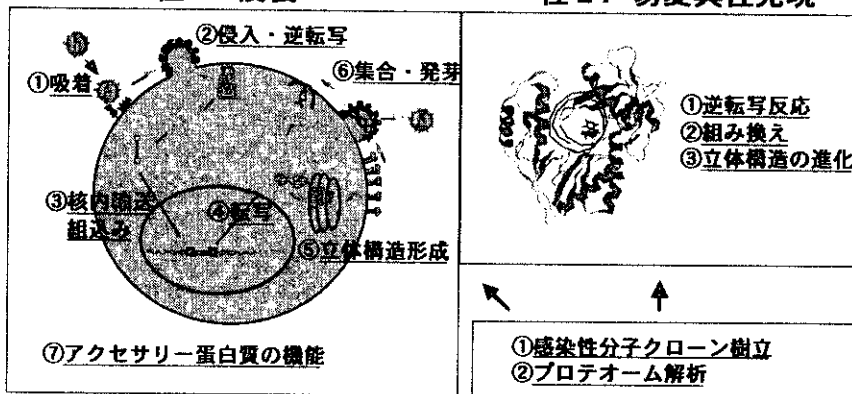
業績一覧参照



# 研究計画 分担18+協力5

## 柱1. 複製

## 柱2. 易変異性発現



- \* 細胞分子装置、分子間相互作用、分子修飾の同定
- ☆ 阻害剤・ワクチン候補の解析 (作用点、効果)
- ◇ 構造生物学的手法の導入

## 柱1. 進捗状況

<b>①吸着</b> ☆庄司; <i>cDDR5-MAP</i> ☆田代; <i>ONO-4007A</i> 原田; 多重結合仮説 服部; ラフト	<b>②侵入</b> *村上; <i>Gp41/ Gag</i> 駒野; <i>ARP2/3</i> 久保; <i>Ankyrin</i>	<b>③核内輸送</b> *間; <i>Rch-1/Vpr</i> *増田(貴); <i>Rch-1/Integrase</i>
<b>④転写</b> * ☆ ◇岡本; <i>RAI</i> 生田; 転写抑制因子	<b>⑤立体構造形成</b> * ◇佐藤; <i>CNX-CRT</i> <i>Gp160</i>	<b>⑥集合・発芽</b> ◇松田; <i>Gp41</i> ヘリックス構造
<b>⑦アクセサリ蛋白質</b> * 増田(道); <i>WEE1-14-3-3β/G2M arrest</i> ◇足立; <i>Vif βstrand</i> 構造 * 明里; <i>Vif1 Gag</i>		

- \* 複製素過程の制御因子・相互作用・修飾の候補を絞り込んだ。
- ☆ 複製阻害法の提案、効果・作用点の解析中。
- ◇ 構造機能関連研究に着手。

## 柱2. 進捗状況

<b>①逆転写反応</b> ◇ 佐藤; 逆転写酵素変異体 * 高橋; <i>RNA断片化, topoisomerase I</i> * 明里; <i>Vif1 Gag</i> 小島; in vitro 侵入系	<b>①感染性分子クローン樹立</b> 異; <i>HIV-1 subtype A, AG, B, C</i> 生田; E 佐藤; E
<b>②組換え</b> * 高橋; <i>RNA断片化, topoisomerase I</i> * 櫻木; <i>RNA 2量体化</i>	<b>②プロテオーム解析</b> * 三腐; <i>p24 formylation</i> <i>CypA isoforms</i>
<b>③変異・進化</b> ◇ 仲宗根; 蛋白質立体構造 横幕; <i>CTL逃避</i>	

- \* 逆転写、組換えの制御因子・反応・修飾の候補を絞り込んだ。
- ◇ 構造機能関連研究に着手。

## II. 分担研究報告書

## HIV-1 の吸着侵入機構と中和機序に関する研究

分担研究者 原田 信志 熊本大学医学部感染防御学講座教授

研究要旨 HIV-1 の感染性と細胞へのウイルス吸着量は温度依存的であり、40℃で1時間の吸着条件で共に最高値を示した。また、HIV-1 吸着後に40℃1時間の処理をしてもウイルス感染価の上昇が認められた。HIV-1 は高温の条件下で、細胞により密に付着し (tight binding)、そのことが感染性の増強をもたらしたと考えた。40℃での吸着後感染増強現象は 0.5β 中和モノクローナル抗体で抑制されることから、この HIV-1gp120 の V3 部位を認識する抗体は tight binding の形成を阻止し、HIV-1 を中和するものと思われた。

### A. 研究目的

ウイルスの受容体を同定しリガンドとその受容体の結合様式を解析することは、そのウイルス感染症の病態理解へとつながるだけでなく、新しい抗ウイルス剤の開発への道をも開くことができる。HIV-1 のコレセプター (CCR5 や CXCR4) の発見でも同様である。しかし、そのような研究の進展にもかかわらず、HIV-1 の吸着や侵入の現象には解決されねばならないものも多い。

我々は、植物由来の糖脂質であるカプシアノサイド G が CD4 と CXCR4 の共集合を誘導し、そのため X4 ウイルスの感染が亢進することを報告した。また、HIV-1 の感染はレセプターの増加あるいは gp120 の多さに比例して増強される。これらの現象は、3 量体である HIV-1 の gp120 と CD4/CXCR4 (あるいは CD4/CCR5) の単一結合だけでは説明できない。また、HIV-1gp120 の V3 部位を認識する中和モノクローナル抗体である 0.5β は、経時的中和反応曲線の解析を行うと、HIV-1 の X4 実験株を 1 粒子・1 分子で強く中和する。これは、この抗体の HIV-1 への付着がエンベロープに steric な変化を起こすためと考えられるが、この変化がなぜ

中和という現象になるのか不明である。

上記の問題の解決のためには、ウイルスと細胞の多重結合 multiple-site binding の概念を再評価する必要がある。細胞膜やエンベロープ上では様々な分子 (レセプターや gp120 などを含む) が浮遊しており、これらの分子はそれぞれの膜の流動性に従って複数の結合 multiple-site binding を形成すると考えられる。その結果、ウイルスは細胞に tight に結合し、侵入・感染へ至る。

我々は、脂質二重膜である細胞膜とエンベロープは、その脂質の特性を考えると、温度依存的に流動性が変化すると仮定した。この流動性の変化が HIV-1 の付着や感染性に影響を与えるのか、また、0.5β 抗体がエンベロープの構造に立体的変化を与えれば、これが multiple-site binding 形成を阻止し中和能を発揮するのか等、その可能性を検討した。それにより、HIV-1 の細胞への吸着・侵入のマクロな機序を明らかにし、新しい中和の作用機作を追究する。

### B. 研究方法

1. 細胞とウイルス : MAGI、GHOST 細胞および HIV-1 の持続感染細胞である MOLT-

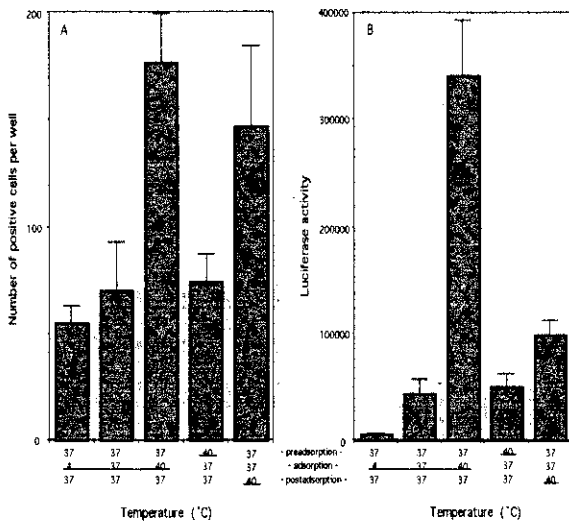
4/HIV-1細胞を使用した。ウイルスはHIV-1のクローン C-2 (X4) 株とルシフェラーゼ遺伝子を有し NL43 の env で pseudotyping した NL43-luc ウイルスを用いた。

2. 感染価の測定：MAGI 細胞と C-2 ウイルスを用いた MAGI アッセイと GHOST 細胞と NL43-luc ウイルスを使用しルシフェラーゼ活性を測定した方法を用いた。また、細胞に吸着した HIV-1 の定量では p24 蛋白を ELISA 法で測定した。
3. 抗体：HIV-1gp120 の V3 部位を認識するモノクローナル抗体 0.5β を使用した。

(倫理面での配慮はこの研究では必要ない。)

### C. 研究結果

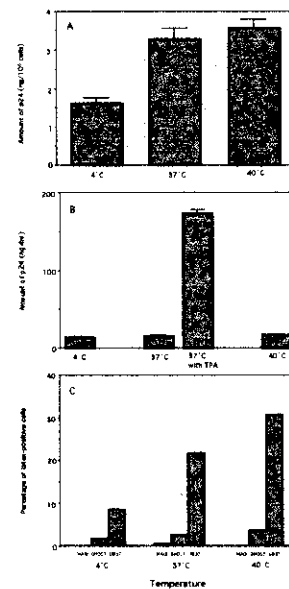
1. HIV-1 感染の温度依存性：MAGI 細胞を用い、HIV-1C-2 の吸着を 4、37、40℃で 1 時間行った。細胞を洗浄後 2 日間培養し、感染細胞を数えた。HIV-1 の感染価（感染細胞数）は温度依存的であり、40℃で吸着を行うと 37℃の 2.5 倍の増加が認められた（図 1A）。また、37℃で 1 時間吸



着を行い、洗浄後 40℃で 1 時間の処理し

ても感染価の上昇が見られた（40℃での吸着後感染増強）。1 回のみ感染系である NL43-luc ウイルスを用いた系でも、同様のデータが得られた（図 1B）。経時的 HIV-1 吸着曲線を解析すると、40℃処理はウイルスの密な吸着速度を早めているだけであった。

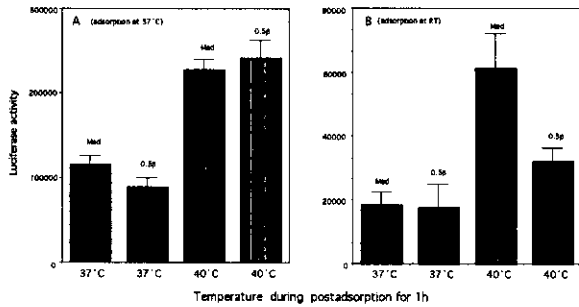
2. HIV-1 吸着量の温度依存性：MAGI 細胞に HIV-1C-2 を 4、37、40℃で 1 時間吸着させ洗浄後、細胞を融解し p24 抗原量を測定した。ウイルスの吸着量は温度依存的であり 40℃で最高値を示した（図 2A）。高温で HIV-1 はより tight に細胞に付着していた。MOLT-4/HIV-1 細胞を 40℃で処



理しても、放出されたウイルス量には変化がなく、高温によるプロウイルスの活性化はなかった（図 2B）。また、ラテックスビーズを用いて細胞の貪食能を測定したが、U937 細胞では温度依存的貪食能の亢進が見られたが、MAGI や GHOST 細胞では貪食能そのものがほとんど認められなかった（図 2C）。

3. 0.5β 抗体による吸着後感染増強の抑制：GHOST 細胞を NL43-luc ウイルスと室温

で1時間吸着させ、洗浄後1 µg/mlの0.5β抗体(90%のHIV-1を中和する濃度)を40℃で1時間作用させた。40℃への移行で約3倍の感染価の増加があったが、この増加は0.5β抗体によって抑制された(図3B)。しかし、この抑制はHIV-1の吸着を37℃で行い、40℃へ移行させると



認められなかった(図3A)。おそらく、37℃では既にある程度のtightな吸着が完了しており、その後の抗体付着では感染を阻止できなかったものと思われた。

4. 他のウイルスでの40℃による感染増強：  
HIV-1ではR5株、またMuLVのエンベロープでも感染増強は認められた。

#### D. 考察

高温の環境下でHIV-1の感染性が亢進した(図1)。また、同じ条件下で洗浄されずに細胞に密に吸着したtight bindingウイルスが増加した(図2A)。この現象は、あらかじめウイルスを吸着させた後の40℃処理でも観察される(図1と3)。また、40℃では単にウイルスが細胞に強固に付着することを早めていることなどを考えると、HIV-1エンベロープと細胞膜の流動性が高温により亢進され、multiple-site binding形成が促進されたと考えた。

中和活性を持つ0.5β抗体は、室温で吸着されたHIV-1の40℃での吸着後感染増強を阻止した(図3B)。この0.5βによる吸着

後中和の機序は；1)抗体が細胞にlooseに結合したHIV-1粒子のgp120 V3の全てに結合し、その後起こるmultiple-site bindingを阻止した；2)抗体がlooseに付着したHIV-1粒子の単一のV3に結合し、エンベロープに構造的変化を起こし(膜流動性が低下し)multiple-site bindingの形成を阻害した、が考えられる。0.5βが1分子で1ビリオンを中和すること、37℃で吸着させるとこの抗体による吸着後感染増強が阻止されないこと(図3A)を考えると、後者の中和機序の可能性が高いと思われる。

40℃での感染上昇はR5株のHIV-1だけでなくMuLVでも見られる。また、様々なウイルスで吸着後のウイルスの中和が報告されている。以上のことにより、多くのウイルスがmultiple-site bindingを用いて感染を成立させていると思われる。

#### E. 結論

HIV-1は、40℃の吸着によって、感染性と密に付着しているウイルス量が増加した。HIV-1の細胞へのtight bindingが感染成立には必要であると思われた。また、V3を認識する中和抗体は、40℃での吸着後感染増強を阻止した。従って、中和の一つの機序として、HIV-1エンベロープの流動性を低めtight bindingを阻害するものがあると考えた。

#### F. 健康危険情報

該当事項無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Yusa, K., W. Song, M. Bartelmann, and S. Harada. 2002. Construction of a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)

library containing random combinations of amino acid substitutions in the HIV-1 protease due to resistance by protease inhibitors. *J. Virol.* 76:3031-3037.

2) Harada, S. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 neutralization by a single molecule of V3-targeted antibody. *Microbiol. Immunol.* 46:857-862.

## 2. 学会発表

1) 原田信志、天白晶、遊佐敬介、前田洋助； HIV-1 の tight binding 誘導とそれを阻止する V3 抗体の中和機序、第 50 回日本ウイルス学会総会、2002 年 10 月、札幌。

2) 遊佐敬介、宗薇、前田洋助、天白晶、原田信志； HIV-1 ライブラリーにおけるプロテアーゼ阻害剤耐性変異の安定性、第 50 回日本ウイルス学会総会、2002 年 10 月、札幌。

3) 前田洋助、天白晶、遊佐敬介、原田信志； HIV 感染前期過程をモニターする系の確立と感染抵抗宿主因子の探索、第 50 回日

本ウイルス学会総会、2002 年 10 月、札幌。

4) 原田信志； HIV-1 の細胞への tight binding：抗体によるその阻止と感染抑制、第 16 回日本エイズ学会総会、2002 年 11 月、名古屋。

5) 遊佐敬介、前田洋助、天白晶、原田信志； V3 ループに多様な変異をもつ R5HIV-1 ライブラリーの作製とその性質、第 16 回日本エイズ学会総会、2002 年 11 月、名古屋。

6) 原田信志、天白晶、遊佐敬介、前田洋助； 単一 V3 抗体分子による HIV-1 の中和、第 16 回日本エイズ学会総会、2002 年 11 月、名古屋。

7) 前田洋助、遊佐敬介、天白晶、原田信志； コレセプター利用性の異なる 2 種類のリポーターウイルスの同時感染におけるウイルス間相互作用の解析、第 16 回日本エイズ学会総会、2002 年 11 月、名古屋。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当事項なし。

## ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）生活環におけるアクチンの役割に関する研究

研究協力者 駒野 淳（国立感染症研究所 エイズ研究センター）

### 研究要旨

actin-related protein 2/3 complex (Arp2/3 複合体) は細胞の形態変化に伴うアクチン細胞骨格の再構成を制御し、細胞膜直下に存在する密なアクチン網 (cortical actin) の一部を構成している。我々は、アクチン新生鎖の合成を誘導する Wiscott-Aldrich syndrome protein (WASP) のC末端に存在するVCA領域を用いて、Arp2/3 複合体の機能を負に制御すると、HIV-1 感染の効率が約20%に低下することを見出した。これは、HIV-1 が効率良く細胞に感染を成立させるためには、膜融合から逆転写反応までの過程に、アクチン新生鎖合成を伴う細胞骨格の再構成が重要であることを示唆するものである。

### A. 研究目的

現在世界的広がりを見せているエイズの流行は、人類の福祉、健康増進を妨げる重大な問題の一つである。ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）に対し、実用に足る有効なワクチンの開発は未だ報告されておらず、化学療法は薬剤耐性ウイルスの発生という難題に直面している。したがってエイズの完全抑止には新たな治療標的の検索が必須である。HIV-1 複製の初期・後期過程は、ウイルスと宿主因子間に複雑かつ特異的な相互作用が起きる。しかし、その分子基盤の大部分が未だに解明されていない。我々の研究は、ウイルス遺伝子産物と宿主因子の相互作用を、特に細胞の構造変化をつかさどるタンパク質に注目することで明らかにし、新たな抗HIV-1 薬剤の開発の可能性を探るものである。

非筋肉細胞の乾燥重量のおよそ1-5%を占めるタンパク質アクチンは、細胞の構造を物理的に支えているほか、運動、輸送など多くの生理作用に重要な役割を持つ。アクチンは多種のウイルスの異なる生活環に関わっていることが報告されている。HIV-1 の生活環とアクチンの関わりについては、(1) ウィルス粒子中にアクチンが取り込まれていることや、(2) アクチンの機能を阻害することが知られている毒素、サイトカラシンD (CCD) でウィルス産生細胞を処理すると、ウィルス産生量が低下すること、(3) さらにCCD処理した細胞にウィルスを感染させると pre-integration complex (PIC) の形成効率が低下し、感染が数%に阻害されることなどが知られている。in vivo において、CCDがアクチン以外のタンパク

質に影響を与えている可能性は否定できないものの、以上の観察結果に基づき、アクチンがHIV-1の生活環に重要な役割を果たしていると考えられている。しかし、アクチンがどのような分子機構でウイルスの生活環を支えているのかは未だに解明されていない。その主な理由は、CCDを用いた研究では、ある生物学的現象にアクチンの機能が重要であるという結論を比較的容易に得ることが出来るという大きな利点がある反面、いかなる分子機構でその現象を支えているのかを知ることが困難だからである。

近年、アクチンの新生鎖重合を制御する細胞因子が同定され、アクチンが細胞の生理を支える分子機構がより深く理解されるようになった。その鍵となる因子が、actin-related protein 2/3 complex (Arp2/3複合体)である。Arp2/3複合体は運動や endocytosis など、細胞の形態変化に伴うアクチン細胞骨格の再構成を制御し、細胞膜直下に存在する密なアクチン網 (cortical actin) の一部を構成している。Arp2/3複合体を中心とするアクチン制御系は、いくつかのウイルスの生活環に影響を及ぼしていることが明らかになってきた。例えば、SV40の細胞内への侵入や、ワクシニアウイルスの細胞からの放出である。さらに、Arp2/3複合体の活性を制御する因子である Wiscott-Aldrich syndrome protein (WASP) の異常が原因として知られるウィスコットーアル

ドリッチ症候群 (Wiscott-Aldrich Syndrome, WAS) の患者由来のBリンパ球は、EBウイルスによって不死化した細胞株を樹立する効率が極めて低い。そのため、WASPの活性はEBウイルスの感染にも影響すると推測されている。

CCDを用いた研究結果と上記のウイルスの知見に基づき、我々はArp2/3複合体活性化を介するアクチン細胞骨格の再構成がHIV-1の生活環にも関与する可能性を考えた。そこで我々は、Arp2/3複合体の活性制御機構の側面から、アクチンがどのような分子機構でHIV-1の生活環を支えているのかを理解するため、特に生活環の初期過程に焦点を当て、以下の研究を行った。

## B. 研究方法

Arp2/3複合体の活性化を制御するため、WASPタンパク質ファミリーの中で最もアクチン新生鎖合成能が高いことで知られるN-WASPを用いた。N-WASPは、C末端のVCA部分を介してArp2/3複合体と結合する。HeLa細胞にVCAを強制発現させると、VCAがArp2/3複合体の活性化を抑制するため、細菌の一種 Yersinia の細胞内への取り込みが阻害されることが知られている。

我々は、VCAをGFPのC末端に結合させた融合タンパク質 (以下GFPVCA) をヒト細胞に発現することが出来るプラスミドベクターを作成した。実験



には、ヒト胎児腎由来の293細胞を用い、リポフェクション法によりGFPVCA発現ベクターとCD4の発現ベクターを10:1の重量比で導入した。さらに、遺伝子導入の効率を測定するため、firefly luciferase (FLuc)を発現するベクターをも同時に遺伝子導入した。遺伝子導入後2日目の293細胞の一部を回収してFLuc活性を計測した。一方、残りの細胞にはrenilla luciferase (RLuc)をマーカー遺伝子として有するHIV-1を感染させた(以下HIV-1/renilla)。HIV-1/renillaはnefの領域にマーカー遺伝子を有するenvのプロウイルスと、env発現ベクターを同時にCOS7細胞に遺伝子導入することにより作製したもので、複製能力を持たない。ELISAにより定量すると、ウイルス液中に含まれるp24の濃度は40ng/mLであった。感染には約 $2 \times 10^5$ 個の細胞にp24の量に換算して40ngのウイルスを20ng/mLの濃度で感染させた。HIV-1/renilla感染の2-3日後に、細胞のRLuc活性を計測した。この値を遺伝子導入効率(FLuc活性)にて標準化し、GFPを単独で発現させた場合を100%として、GFPVCA発現細胞へのHIV-1感染効率を求めた(図1A参照)。

### C. 研究結果

#### 1. GFPVCAの発現と細胞への影響 GFPVCAの発現は、蛍光顕微鏡に

よる観察にて主として293細胞の細胞質に存在する事が観察された。FACSにより解析すると、対照としてもちいたGFP発現細胞とGFPVCA発現細胞の緑色蛍光profileはほぼ同じであった。また、通常の細胞培養条件下で、GFPVCA発現による細胞の形態および生理に大きな変化は観察されなかった。すなわち、CD4の細胞膜における発現量、細胞周期、viability、lipid microdomainの分布にGFP発現細胞とGFPVCA発現細胞の間に有意な差を認めなかった。GFPVCAの発現ベクターと同時に293細胞に導入されるレポーター遺伝子(FLuc・RLuc)の転写/翻訳効率は、約30%抑制されることが判明した。これはHIV-1のLTRを含めた異なるプロモーターとレポーター遺伝子に共通した現象であった。

#### 2. HIV-1/renillaの感染効率

GFPのみを発現する293細胞へのHIV-1/renillaの感染効率を100%とすると、GFPVCAを発現する293細胞へのHIV-1感染効率は $22 \pm 9\%$  (n=3)であった。(図1B参照)。

### D. 考察

HIV-1感染の初期過程は、大別すると(1)細胞とウイルスの結合、(2)膜融合、(3)disassembly、(4)細胞質内の輸送、(5)逆転写、(6)核移行、(7)ウイルスゲノムの染色体DNAへ

の組み込みの各段階からなる。CCDを用いた過去の実験結果と、今回の研究結果を総合的に判断すると、上に挙げた過程のうちArp2/3複合体の機能が積極的に関わる可能性が高いのは、おそらく(2)膜融合から(5)逆転写までの過程であると考えられる。

さらに、これまでに知られているArp2/3複合体の機能を鑑み、我々はアクチンがどのような分子機構でHIV-1の生活環を支えているのかについて、次のような仮説を提唱する。細胞質内での物質の輸送には、大別してアクチンに依存する輸送系と、微少管に依存する輸送系の二つが存在する。HIV-1が細胞質を横切り、細胞の核に接近するために利用する系は、主として微少管に依存する系である可能性が示されている。しかし、微少管は細胞膜直下に直接結合していないことから、HIV-1が微少管にアクセスするまでの輸送にはアクチンに依存する輸送系を利用している可能性がある。cortical actinは密な網目構造であるため、HIV-1は受動的にこれを通る事ができないと思われる。したがって、HIV-1はArp2/3複合体を活性化し、アクチン新生鎖合成によって生じる推進力を利用してcortical actinを通り、微少管にアクセスするのかもしれない。

#### E. 結論

GFPVCAを用いてArp2/3複

合体の機能を負に制御すると、HIV-1感染の効率が約20%に低下する。これは、HIV-1が効率良く細胞に感染を成立させるためには、膜融合から逆転写反応までの過程に、Arp2/3複合体の活性化を介して、アクチンの新生鎖合成を伴う細胞骨格の再構成が重要であることを示唆するものである。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

駒野 淳: Possible involvement of cytoskeleton in the HIV-1's life cycle?、第5回日本レトロウイルス研究会「夏期セミナー」、平成14年9月6日-8日(豊橋)

駒野 淳: Toward the understanding of the post-entry process of HIV-1: an active actin cytoskeletal reorganization supports viral entry、学友会シンポジウム「HIV複製素過程研究の先端」、平成14年11月26日(東京)

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

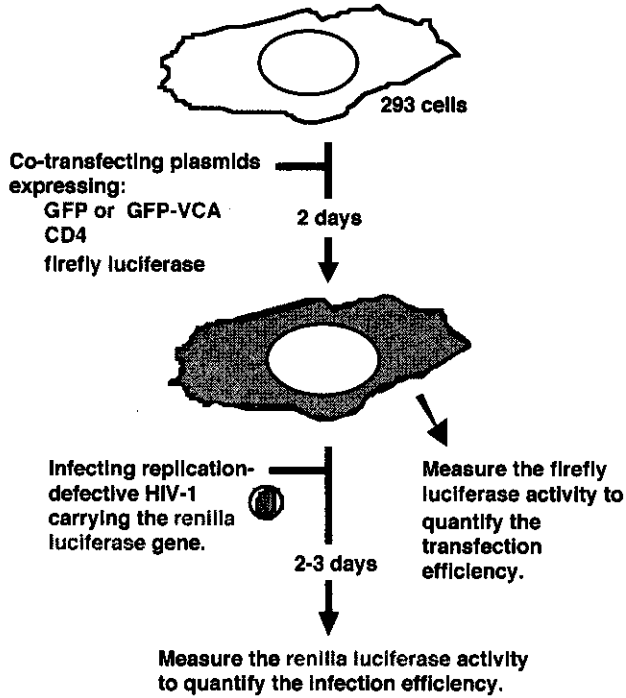
##### 2. 実用新案登録

なし

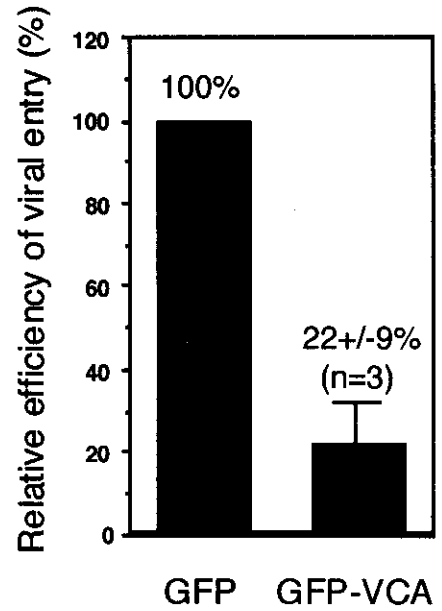
##### 3. その他

なし

## A. Experimental design



## B. Results



1. Effect of GFP-VCA expression on the early phase of HIV-1's life cycle

#### 4. Env/Gag 蛋白の相互作用と HIV-1 の細胞侵入との関連

協力研究者 村上 努 琉球大学医学部附属沖縄アジア医学研究センター助教授

共同研究者 Eric O. Freed (NIAID, NIH, USA)

研究要旨: 標的細胞への吸着・侵入段階における HIV-1Gag 蛋白のプロセッシング、Env 蛋白 gp41 細胞質内ドメイン (gp41CT) の役割の解明のため、HIV-1 プロテアーゼ欠損変異株、gp41CT 変異株を用いて標的細胞との融合過程への影響を検討した。

1) HIV-1 と標的細胞との融合過程に Gag 蛋白のプロセッシングが必要なこと、2) Gag 蛋白前駆体との相互作用ができなくなった gp41CT 変異株では、Gag 蛋白のプロセッシングなしでもウイルスと細胞との膜融合が起こることを明らかにした。以上の結果は、1) gp41CT と Gag 蛋白前駆体との相互作用が Env 蛋白の高次構造を膜融合不活性にし、2) その抑制が Gag 蛋白のプロセッシングまたは gp41CT 変異株で解除されることを示唆している。

##### A. 研究目的

我々はこれまでに、HIV-1Env 蛋白のウイルス粒子への取り込みには、gp41 細胞質内ドメイン (gp41CT) が必要であることを多くの T 細胞株やマクロファージを用いて明らかにした。最近、我々と他の研究者らは、1) プロテアーゼを欠損した未成熟 HIV-1 粒子内で、gp41 と Gag 蛋白前駆体 (Pr55<sup>Gag</sup>) が界面活性剤に抵抗性の相互作用を示すこと、2) その相互作用は、Env 蛋白のウイルス粒子への取り込み阻

害を示す gp41CT 変異株、またはプロテアーゼの作用した成熟 HIV-1 粒子中では解除されてしまうことを見出した。これらの結果は、gp41 と Pr55<sup>Gag</sup> の相互作用は、Env 蛋白のウイルス粒子への取り込みには必要であるが、放出され成熟し、次の感染へ向かっているウイルス粒子には不必要であることを示唆している。Gag 蛋白中のマトリックス蛋白 (MA) が Gag 蛋白のプロセッシングによってそのコンフォメーションを変化させるという報告を考えあわ