

せて、以下のような作業仮説（図3）を考えた。プロテアーゼが作用する前の未成熟 HIV-1 粒子中では gp41 と Pr55<sup>Gag</sup> の相互作用によって Env 蛋白が膜融合不活性な状態に抑制されており、ウイルスが成熟前に不都合な膜融合を起こすことを防止している。次に Gag 蛋白のプロセッシングによる MA のコンフォメーション変化が引き金になって gp41 と Gag 蛋白の相互作用が弱まり、同時に Env 蛋白のコンフォメーションが膜融合活性型に変換され、新たな感染の準備が整うというものである。そこで、この仮説の検証を HIV-1 プロテアーゼ欠損変異株、Pr55<sup>Gag</sup> との相互作用ができない 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することにより実施した。

## B.研究方法

### （1）細胞融合アッセイ（1）：

293T 細胞に Env 欠損 HIV-1 プロウイルス DNA（プロテアーゼ無傷または欠損株の両方）と Env 発現プラスミド（野性株と gp41CT 変異株）をコトランスフェクトして得られたシュードタイプ HIV-1 を遠心濃縮（10

倍）し、標的細胞である Jurkat 細胞に添加して 20 – 24 時間培養した。生じた巨細胞（直径が未融合の1個の細胞の約4倍以上のもの）を検鏡下で計測した。

### （2）細胞融合アッセイ（2）：

Env 欠損・逆転写酵素欠損 HIV-1 プロウイルス DNA（プロテアーゼ無傷または欠損株）と Env 発現プラスミドを用いて（1）と同様に濃縮ウイルスを調製し、Jurkat-tat 細胞と LuSIV 細胞（レポーター遺伝子として SIV-LTR の下流に連結されたルシフェラーゼが組み込まれている）の混合培養に添加して 20 – 24 時間培養した。細胞回収・破碎後、細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定した。

### （3）シュードタイプ HIV-1 粒子中の Env 蛋白量の定量：（1）または（2）の方法で作製した濃縮ウイルスの破碎液を材料に、エイズ患者血清（NIH AIDS Research

Reference and Reagent Program)、抗 gp41 モノクローナル抗体 (T32) (NIH, P. Earl 博士分与)によるウエスタン法により解析した。

(倫理面での配慮)

該当事項なし。

### C. 研究結果

(1) Gag 蛋白質前駆体 (Pr55<sup>Gag</sup>) プロセッシングがウイルス-細胞融合に与える影響 (図1 および図2)

Pr55<sup>Gag</sup> のプロセッシングがウイルス-細胞融合に与える影響を細胞融合アッセイ (1) を用いて検討した。野生型 Env を持つシュードタイプ HIV-1 では、プロテアーゼ欠損株の膜融合がプロテアーゼ無傷株のそれと比較して著しく減少していた。それに対して、Gag 蛋白質前駆体との相互作用ができなくなった2つの gp41CT 変異 Env を持つシュードタイプ HIV-1 では、プロテアーゼ欠損株の膜融合がプロテアー

ゼ無傷株のそれとほぼ同程度であった (以上、図1)。同様の結果が細胞融合アッセイ (2) によっても得られた (図2)。

(2) シュードタイプ HIV-1 粒子中の Env 蛋白質量のウエスタン法による解析

p24 蛋白質で標準化したシュードタイプ HIV-1 粒子中の Env 蛋白質量をエイズ患者血清、抗 gp41 モノクローナル抗体 (T32) によるウエスタン法により解析した。いずれのシュードタイプ HIV-1 においてもプロテアーゼ無傷・欠損株間で Env 蛋白質 (gp41) 量にほとんど差は認められなかった (データ省略)。同様の解析を gp120 について <sup>35</sup>S-Met/Cys でラベルした細胞から産生されたウイルスについて行ったところ、プロテアーゼ無傷・欠損株間のウイルス gp120 量はほぼ同程度であった (データ省略)。

#### D. 考察

標的細胞への吸着・侵入段階における HIV-1 Gag 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、Gag 蛋白前駆体との相互作用ができなくなった2つの 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。その結果、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、3) 上記の結果は、プロテアーゼ無傷・欠損株間の Env 蛋白量の差によるものではないことが示された。以上の結果は、1) gp41CT と Gag 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といふ我々が提唱した作業仮説 (図3) を支持するものである。今後の予定は、1) より厳密な意味でのウイルス-細胞融合アッセイ系で今回観察した現象を確認すること、2) gp41CT と Gag 前駆体との相

互作用による膜融合の抑制と Gag 蛋白のプロセッシングによる抑制解除が HIV-1 の標的細胞への吸着・侵入のどの段階で起こっているかを明らかにすることなどである。

#### E. 結論

HIV-1 の標的細胞への吸着・侵入段階における、gp41 細胞質内ドメインと Gag 前駆体との相互作用による膜融合の抑制と Gag 蛋白のプロセッシングによる抑制解除という、このウイルスの侵入調節機構を支持する実験結果を得た。

F. 健康危険情報  
特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Nishiyama, Y., T. Murakami, S. Shikama, K. Kurita, and N. Yamamoto. 2002. Anti-HIV-1 peptides derived from partial amino acid sequences of CC-chemokine RANTES. *Bioorg. Med. Chem.* 10:4113-4117.

## 2. 学会発表

1. Murakami, T., S. Ablan, Y. Tanaka, and E. O. Freed. Relationship between Env-Gag interactions and Env-mediated membrane fusion. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor, N.Y., USA. 21-26 May, 2002.

2. 村上 努、田中勇悦 Relationship between Env-Gag interactions and virus-cell fusion. 第50回日本ウイルス学会学術集会、平成14年10月16-18日(札幌)

3. 村上 努 Relationship between Env-Gag interactions and virus-cell fusion. 学友会主催シンポジウム 『HIV 複製過程研

究の最先端』平成14年11月26日(東京)

4. 村上 努、田中礼子、広瀬国孝、谷中幹郎、山本直樹、田中勇悦 新規低分子化合物 T-1113 の抗 HIV-1 活性と作用機序の検討 第16回日本エイズ学会集会・総会 平成14年11月28日-30日(名古屋)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当事項なし。

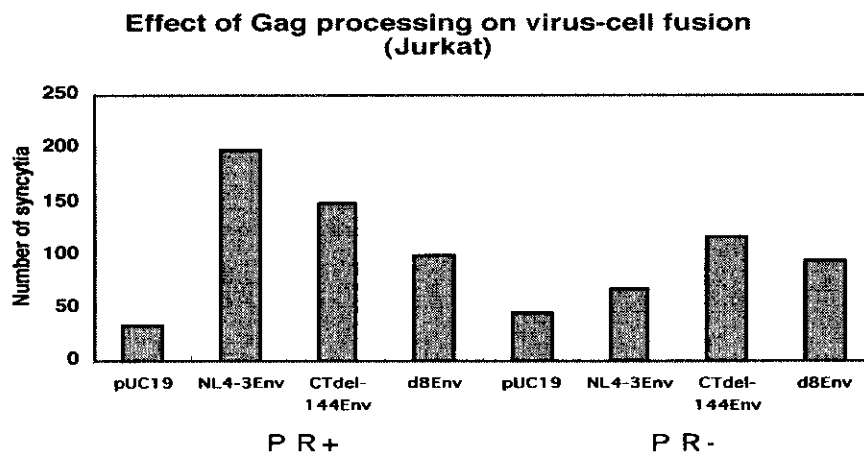


図1. 野生型 NL4-3Env を持つシュードタイプ HIV-1 では、プロテアーゼ欠損株の Jurkat 細胞との融合(右側の4列)がプロテアーゼ無傷株のそれ(左側の4列)と比較して著しく減少していた。それに対して、Gag 蛋白前駆体との相互作用ができなくなった2つの gp41CT 変異 Env (CTdel-144, d8)を持つシュードタイプ HIV-1 では、プロテアーゼ欠損株の膜融合がプロテアーゼ無傷株のそれとほぼ同程度であった (なお、pUC19 は Env なしのバックグラウンドを示す)。

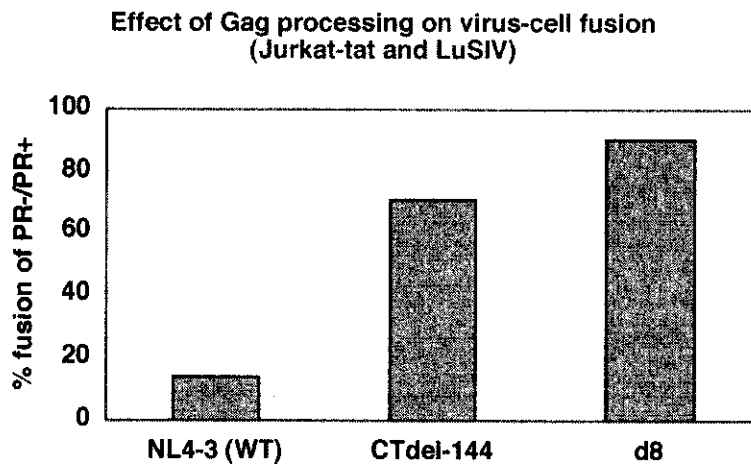


図 2. Jurkat-tat 細胞と LuSIV 細胞を用いたウイルス-細胞融合系においても、野生型 NL4-3Env を持つシュードタイプ HIV-1 では、プロテアーゼ欠損株の膜融合がプロテアーゼ無傷株のそれと比較して著しく減少 (20%未満) していた。それに対して、2つの gp41CT 変異 Env (CTdel-144, d8) を持つシュードタイプ HIV-1 では、プロテアーゼ欠損株の膜融合がプロテアーゼ無傷株のそれとほぼ同程度 (70-90 %) であった。

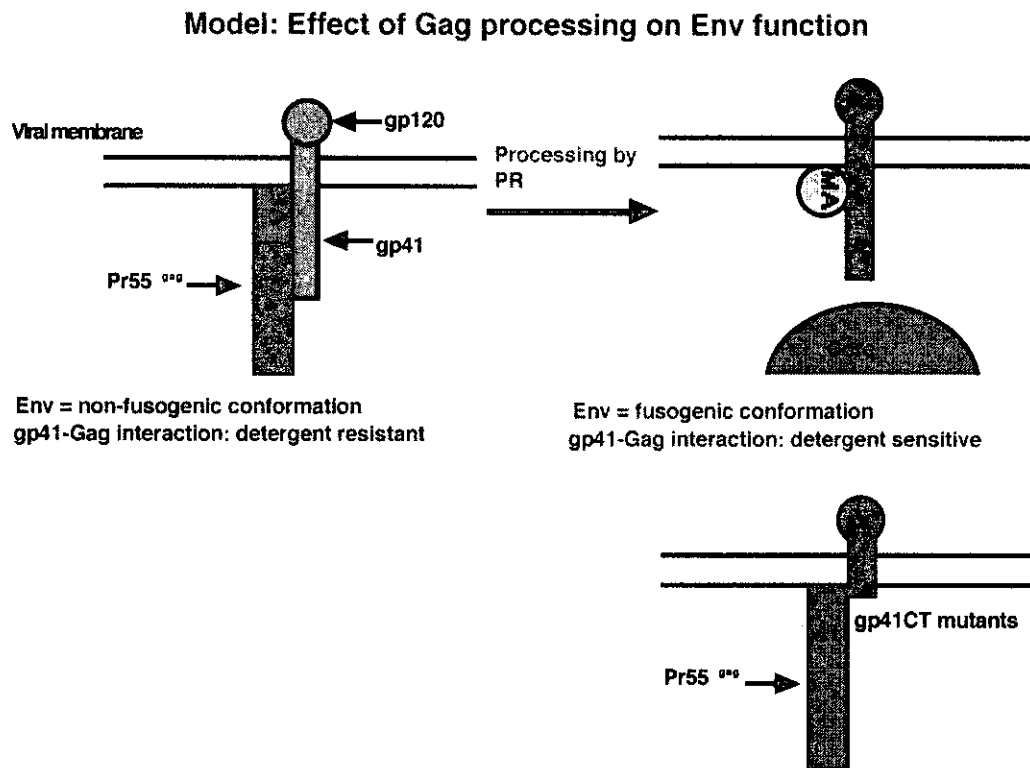


図 3. 1) gp41CT と Gag 前駆体との相互作用が Env 蛋白の高次構造を膜融合不活性にし、  
2) その抑制が Gag 蛋白のプロセッシングまたは gp41CT 変異株で解除される。

## 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

服部俊夫 東北大学大学院医学系研究科感染症態学分野 教授

研究協力者 凌虹 宇佐美修

### 研究要旨

HIV の感染機構の解析ために、BH-10 株の gp120 の V3 領域の細胞膜結合部位を N 端と決定した。また post-fusogenic gp41 を認識するモノクロナル抗体(50.69)陽性 gp41 が細胞膜上で raft と挙動をとともにすることを明らかにした。

### A. 研究目的

HIV が標的細胞に感染する際の二つの受容体と Envelope の時空変化の詳細を明らかにする。gp120 の V3 ループの細胞膜結合領域を V3 ループの種々のエピトープを認識する抗体で解析した。また融合にかかわる、gp41 の C 領域と N 領域が作る post-fusogenic form を認識する抗体 50.69 を用いて、50.69 抗体陽性の gp41 の膜上での存在様式を raft との関係で明らかにした。

### B.材料・方法

合成 V3 ペプチド: 昨年度の報告書に記載した合成ペプチドを使用した。

細胞結合 V3 ペプチドの検出: V3 loop の様々なエピトープを認識するモノクローナル抗体 (NIBSC,UK) (図1) を使用し、T 細胞株である、CEM, CEM.CCR5, HOS および HOS.CXCR4 に結合した V3 ペプチドを検出した。細胞を V3-BH10, V3-BH10/CA, NNT24, 及び V3-ADA, -89.6 でそれぞれ 37°C 1時間処理した後に、洗浄し、細胞膜表面上のペプチドを種々の抗体と反応させ、結合した抗体は、FITC 結合第2抗体で検出した。

ELISA による V3 ペプチドの検出: PBS に 1 μM の濃度で溶解したペプチドを 96 穴の ELISA に反応させ、PBS-T (PBS 含 0.05% tween 20)で洗浄した後に 37°C 1時間 0.5%

BSA 含有 PBS でブロックした。その後、モノクロナル抗体を加え 37°C で 2 時間反応させた。結合した抗体は horseradish peroxidase-結合抗ヒトあるいはマウス抗体で検出し、OPD で発色させた後に測定した。

50.69 抗体陽性細胞の検出: 50.69 抗体陽性 gp41 が SCD4 を添加される以前の H9/IIIB 細胞上に存在することを FACS と間接蛍光抗体法を用いて示した。ホルマリンで固定し、saponin 処理した H9/IIIB 細胞に 50.69 抗体を加えて 37°C で一時間インキュベート後、wash し、ビオチン化抗ヒト抗体につづいてストレプトアビジン Alexa568 で染色した。

### C 研究結果

種々のウイルス由来ビオチン化 V3 ペプチドの細胞膜への結合 我々は以前ビオチン化 V3 ペプチド(BH-10)が T 細胞株、末梢単核球、マクロファージのみならず、アストログリア細胞 (U87) に結合するがビオチン化 V3 ペプチド ADA は殆ど結合しないことを報告した。V3 のチップを認識する抗体を用いた方法によると、V3-BH10 と V3-BH10/CA の結合ばかりでなく、V3-89.6 の結合が観察された。V3-BH10/CA の結合は V3-BH10 のそれよりも低く、V3-NNT24 や V3-ADA の結合はみられなかった。これらの V3 loop の結合はやはり T 細

胞にとどまらず、補受容体の発現しない細胞(U87,HOS)にもみられた。

**V3 loop の N 端が結合に役立つ:** V3 loop のどの領域が細胞膜に結合するかを検索した。mAb IIIB-V3-21 を除くすべての抗体が細胞膜表面に結合した。(図 2)。結合の程度は様々であるがループのチップに反応する mAb IIIB-V3-13 が最もよく反応する。V3-BH10/CA の結合は V3-BH10 のそれにくらべて低く、V3-NNT24 は殆ど検出できなかった。ELISA プレート上のペプチドには全ての抗体が反応した。(図 3)

#### **50.69 抗体陽性 gp 41 の細胞膜存在様式:**

H9/IIIB 細胞表面に Red 蛍光を認め、この蛍光はコントロール陰性抗体では認められなかった。また、gp41 細胞内ドメインと結合しする chessie8 を FITC を用いて、50.69 と多重染色したところ、chessie8 の蛍光が存在する細胞膜近傍と、50.69 の蛍光は一致した。Rafts をコレラトキシン FITC で蛍光し、50.69 と二重染色したところ、両者は一致した。(図 4)

#### **D. 考察**

我々は昨年 V3 ペプチドがそれが由来するウイルスの gp 120 を活性化し、感染を促進することをみいだした (Ling et al. BBRC). ここでは X4 と R5X4 の HIV (V3-BH10 と V3-89.6) 由来の V3 ループが CD4 や補受容体の発現にかかわらずに、細胞膜表面に結合することを見出した。標的分子の一部はプロテアーゼ様分子や、CXCR4 が関与すると思われるが、それ例外の分子は不明である。その結合は立体構造に依存していた、しかし R5 HIV 由来の V3-ADA は殆ど結合しなかった。V3 loop の結合領域は mAb IIIB-V3-21 で規定される N-端であることが想定された。

50.69 抗体を用いた研究で細胞内で gp41 が集合している領域に fusion core が存在することを示した。また、細胞表面には raft と呼ばれる領域が存在し、raft には gag とエンベロープ蛋白が集合し、この部位からウイルスが出芽することが知られている。これは、gp41 の fusion core が rafts に集中していることをしめしており、post-fusogenic form gp41 が rafts に存在していることを示すものである。

#### **E. 結論**

HIV の感染には gp 120 と gp 41 の立体構造とその変化を勘案しながら、より詳細な研究が必要である。特に V3 ループの N 端に重要な活性があることが他でも知られているのでその結合分子についても解析したい。Post-fusogenic 抗体を認識する gp 41 を認識する抗体が raft に存在する gp41 に反応することより、その意義について更なる研究が必要である。

#### **G. 研究発表**

##### **論文発表**

1. Ashino, J., I. Ohno, S. Okada, K. Nishimaki, Y. Saito, M. Endo, M. Kaku, H. Sasano, and T. Hattori.: 2002. A long culture period was necessary for identification of mycobacteria tuberculosis in a patient with disseminated tuberculosis. *Kekkaku* 77:73-77,
2. Okada S, M. Kikuchi, H. Hasegawa, M. Ishikawa, I. Ohno, M. Kaku, and T. Hattori .: 2002 Delayed recovery of effector memory CD4+ T cells by highly active antiretroviral therapy in a patient with HIV-1 infection. *Tohoku J. Exp. Med.*, 196:213-218.
3. Shirota H, K. Sano, N. Hirasawa, T. Terui, K. Ohuchi, T. Hattori, and G. Tamura.: 2002 B Cells Capturing Antigen Conjugated with

CpG Oligodeoxynucleotides Induce Th1 Cells by Elaborating IL-12. *J. Immunol.*;169:787-794.

4. **Ling H, D-J. Li H-X. Gu. T. Hattori .:** 2002 The binding ability of region derived from diverse human immunodeficiency type 1(HIV-1) to different cells. *中国免疫学雑誌* 18:236-244.

5. **Ling H, X. Zhang, O.Usami, and T. Hattori .:** 2002 Activation of gp120 of human immunodeficiency virus by their V3 loop derived peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297:625-631.

6.**Hattori T.:** 2002 Primary HIV Infection. *Internal Medicine* 4:918-919.

7. **Sano K, H.Shirota, T.Terui, T.Hattori, and G.Tamura.:** Oligodeoxynucleotides without CpG Motifs Work as Adjuvant for the Induction of Th2 Differentiation in a Sequence-Independent Manner. *Journal of Immunology* in press

学会発表

国内

1. Hong L, Xu Y, Hattori T.:Analysis of HIV-1 entry using derived peptides.

第 22 回東北免疫研究会、仙台、2002 年

3 月 1 日

2. 宇佐美修、杉浦久敏、服部俊夫：カリニ肺炎を併発した AIDS 症例の臨床症状と分離ウイルス 第 167 回日本内科学会東北地方会、仙台、2002 年 6 月 15 日

3. 宇佐美 修, 凌虹, 服部俊夫 HIV 感染における gp41 の立体構造変化を認識する抗体の特性 第 16 会日本エイズ学会シンポジウム 9 感染成立とその防御、名古屋、2002 年 11 月 29 日

4. 服部俊夫 免疫再構築症候群-現状と考察-

第 16 会日本エイズ学会シンポジウム 11 Immune Reconstitution Syndrome にどう対するか、名古屋、2002 年 11 月 29 日

5. 凌虹、服部俊夫 第 16 会日本エイズ学会一般演題 V3 ループペプチドによる gp120 の活性化機構、名古屋、2002 年 11 月 29 日

海外

1. Ling H, Usami O, Hattori T.:V3 Loop Peptides Enhance HIV-1 Entry.

The Second Collaborative Research Seminar on HIV and other Viral Entry Inhibitors, NY, May 3-5, 2002



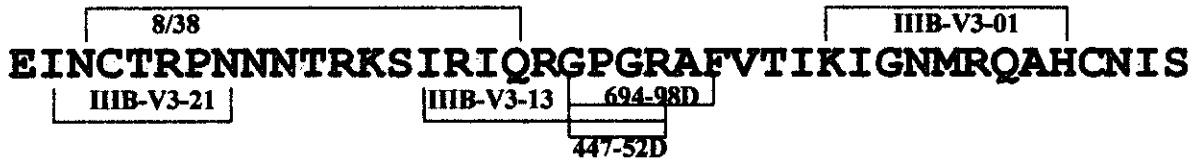


Fig. 1 The epitopes of mAbs anti-V3 loop

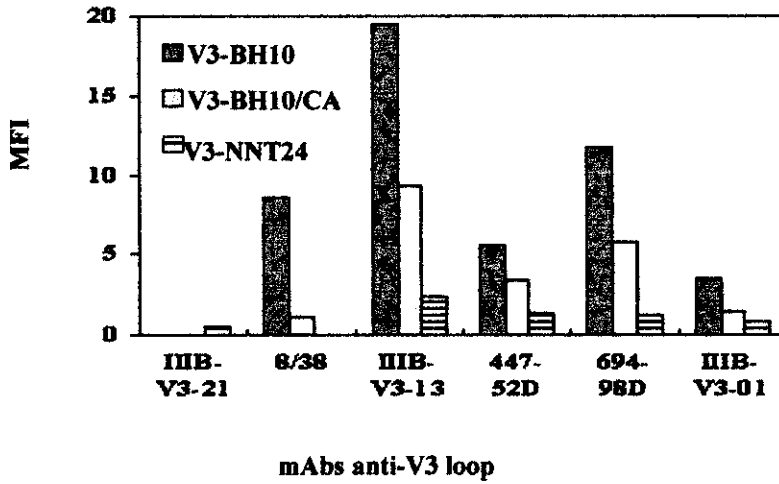


Fig. 2 Detection of cell-bound V3 peptides by mAbs against various regions of V3 loop

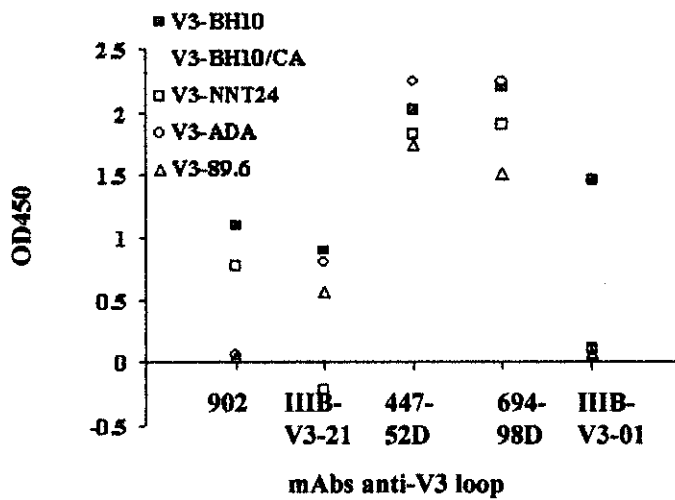


Fig. 3 Detection of plate-bound V3 peptides by mAbs against various regions of V3 loop

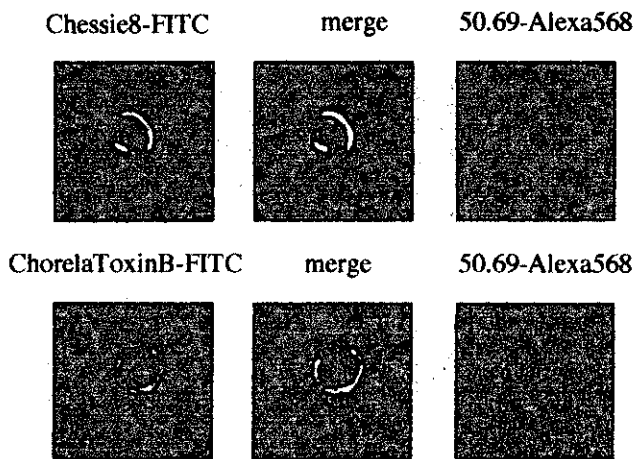


figure4 抗gp41抗体 cheshire8をFITC、抗gp41抗体50.69を alexa568と結合させて、間接蛍光抗体法で confocal microscopeを用いて観察した。中央は merge  
下段 raftsを ChorelaToxinB-FITCで 蛍光ラベルした。50.69-Alexa568と2重染色した。中央はmerge。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究）  
分担研究報告書

6. HIV侵入の無細胞解析系におけるウイルス感染特異性

分担研究者 小島 朝人 国立感染症研究所・感染病理部・室長  
研究協力者 原田 貴之 国立感染症研究所・感染病理部・協力研究員

研究要旨：HIVはEnvとリセプターとの結合・膜融合・脱殻を経て感染する。この侵入効率には種々のウイルス側・細胞側因子の関与が考えられるが、生細胞全体を用いた従来法では、その解析は困難であった。そこで本研究では、in vitro細胞侵入系の樹立を試みてきた。その結果、(Ⅰ)リセプター群を含む細胞膜画分を調整し、(Ⅱ)非感染性粒子を除去した精製HIV画分とインキュベーションして、(Ⅲ)Env特異的に、(Ⅳ)CD4特異的に、(Ⅴ)X4/R5コリセプター特異的に、(Ⅵ)温度依存的に、p24がX4/R5 HIV粒子から遊離するin vitro膜融合反応系を確立した。

A.研究目的

HIVはEnvと細胞膜セプターとの結合・融合・脱殻を経て細胞に侵入する。HIV侵入解析系はこれまで主に生細胞が用いられていたため、ウイルスの吸着・侵入の素過程に関与する細胞内因子等の解析を困難にしていた。そこで、これまでの本研究で無細胞解析系の確立を試み、精製 X4 ウイルスと細胞膜との反応で、HIVから遊離するコア蛋白質 p24 を検出する系を報告してきた。本年度は、この反応系に Env 欠損 X4 HIV 或いは R5 HIV を用いて、Env 特異性、ウイルストロピズム及び細胞膜画分のコレセプター特異性を調べ、細胞全体を用いた際に観察される、標的細胞感染特異性を反映するか否か検討を行った。

B.研究方法

細胞をホモジナイズ後Percollに積層し、15,000gで5分間遠心した上清を膜画分とした。膜精製度は、細胞質混入の指標としてLDH活性の測定、細胞膜画分の指標としてGb膜蛋白のウエスタンブロットを行

って判定した。HIVはX4ウイルスのNL432とEnv欠損NL432、及びR5ウイルスのJRFLを用い、既に報告した方法により感染性ピリオンを精製した。反応は精製細胞膜画分と、精製HIVピリオンを混合後、37度でインキュベートした。反応液から超遠心で未反応のHIV粒子・膜画分を除去し、上清中の遊離p24量をELISAで測定した。抗-CD4単クローン抗体、SDF-1は市販品を用いた。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

C.研究結果

調整した細胞膜画分は未精製細胞膜ホモジェネート画分に比べてLDH活性が顕著に低く、逆にGb膜蛋白は効率よく濃縮されていたため、少なくとも6倍以上の精製度と考えられた。この方法で調整したCD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>/CCR5<sup>+</sup>陽性のMAGIC5細胞膜画分にX4 HIVのNL432ピリオンを反応させると、加えた膜蛋白量あるいはピリオン量に依存し、かつ、温度依存的に遊

離p24量の上昇が観察された。しかし、Env欠損NL432ピリオンを用いた場合にはp24の遊離が観察されなかった。他方、R5 JRFLピリオンを用いた場合には、CD4<sup>+</sup>/CXCR4<sup>+</sup>/CCR5<sup>-</sup>のMAGI細胞膜画分との反応ではp24の遊離が観察されず、CCR5陽性のMAGIC5細胞膜画分とのみp24量の遊離上昇反応を生じた。このX4及びR5 HIV反応系に抗-CD4抗体を添加すると、遊離p24量の上昇はいずれも抑制された。

#### D. 考察

HIVが標的細胞に感染する最初のステップは、ウイルスの吸着・膜融合・脱殻である。しかしながら、この単位過程を定量的に検討できるin vitro解析系が存在しなかったため、感染者から分離されたHIVの感染性が侵入効率によるのか、その後の複製効率によるのか不明であった。本研究では、感染性ピリオンのみを精製すること、標的細胞の膜画分を精製することによって、生細胞を用いないHIV侵入のin vitro解析系の確立を試みてきた。その結果、上記C. 研究結果の項に記載したように、本研究における無細胞反応系はCD4、Env及びX4/R5 HIVに特異的であることが示された。従って、本反応系が生細胞におけるHIV侵入を反映していることが示唆され、HIV分離株の感染性検討、ひいては、HIV侵入阻害剤開発の有用なツールになるものと考えられる。

#### E. 結論

本研究では、HIVの細胞侵入in vitro解析系の樹立を試みた。その結果、(田)リセプター群を含む細胞膜画分を調整し、(用)非感染性粒子を除去した精製HIV画分とインキュベーションして、(火)Env特異的に、(水)CD4特異的に、(木)X4/R5コリセプター特異的に、(金)温度依存的に、p24がX4/R5 HIV粒子から遊離するin vitro膜融合反応系を確立した。

#### F. 健康危険情報

該当事項無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Harada, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Koyanagi, Y., Sata, T., Kurata, T., and Kojima, A.: Role of Nucleotide Sequences in the V3 Region in Efficient Replication of CCR5-Utilizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Macrophages. *Virology* 299, 192-203, 2002.

2) Hasegawa, H., Tatsumi, M., Ogawa-Goto, K., Takahashi, H., Kojima, A., Iwasaki, T., Kurata, T., Sata, T., Takeuchi, T., Sheehy, N., Sawa, H., Nagashima, K., and Hall, W. W.: Processing of the HTLV-II Envelope Precursor Glycoprotein gp63 by Furin Is Essential for Cell Fusion Activity. *AIDS Res. Human Retroviruses* 18, 1253-1260, 2002.

##### 2. 学会発表

1) 原田貴之、横田恭子、小柳義夫、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：HIV-1 R5ウイルスのM-トロピズムにおけるV3ヌクレオチド配列の役割。第50回日本ウイルス学会学術集会、2002年10月、札幌。

2) 原田貴之、佐多徹太郎、倉田毅、小島朝人：HIV侵入の無細胞解析系におけるウイルス感染特異性。第16回日本エイズ学会学術集会、2002年11月、名古屋。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項無し。

## 7. HIV-1Vpr と相互作用する細胞内因子の解析 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)

研究要旨：これまで我々は、HIV-1Vpr が核膜孔蛋白質と核膜で直接結合した後に、importin  $\alpha$  を介して核移行することを明らかにしてきた。本研究において我々は、Vpr の核移行はその N 端側に存在する  $\alpha$ -helix ドメインと importin  $\alpha$  の CAS 結合ドメインとの間接結合を介して行われることを立証した。次に、複数ある importin  $\alpha$  の isoform の内、M-CSF で分化させたマクロファージにおいて高レベルな発現が認められた Rch1 が、Vpr の核移行を最も促進すること、また、核移行能を消失した Vpr を有する HIV-1 はマクロファージにおける感染性が失われることを見出した。以上の結果から、生体内のマクロファージにおける HIV-1 感染において、Vpr の核移行能が必須であることが示された。

Vpr と相互作用する細胞内因子としてこれまでに報告のなかった spliceosome-associated protein 145 (SAP145) を見出した。SAP145 は、スプライシングの際、mRNA 前駆体のランチ部位に結合する U2snRNP に含まれる splicing factor 3b (SF3b) を構成する分子であることから、 $\alpha$ -globin mRNA 前駆体を材料としてそのスプライシングにおける Vpr の効果を調べた。その結果、Vpr の過剰発現によって  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体からのイントロン 1 のスプライシングが阻害されることを初めて見いだした。この阻害効果は Vpr の C 末端 77-96 領域を導入した場合にも認められた。さらに、免疫沈降において、77-96 領域は SAP145 と相互作用することも確認できた。

### A. 研究目的

HIV-1 アクセサリー遺伝子の一つである Vpr 産物は AIDS 患者の血清中に大量に存在し、ウイルス感染効率の上昇および HIV 潜伏感染細胞からのウイルス産生を惹起するなど、AIDS 発症の key factor として注目されている。また、リンパ球系細胞を G2 期で arrest すること、細胞の分化、多倍体化、アポトーシスを誘導することも明らかになった。興味深いことに最近、Vpr 蛋白が HIV 感染細胞を G2 期で arrest させる結果として、ウイルスの複製効率を著しく高めること、さらに可溶化 Vpr 蛋白を HIV 非感染細胞に添加すると、アポトーシスが誘導されることが証明された。従って、Vpr 蛋白の多様な機能の発現機序の解明がエイズ発症機構を明らかにするためには必須であるといえる。また、Vpr 蛋白は preintegration complex (PIC) を形成することにより、マクロファージなどの非分裂細胞においてウイルス核酸の核移行を促すことが明らかになっている。

Vpr 蛋白は、 $\alpha$ -helix、ロイシンジッパー様、アルギニンに富むドメインから構成されており、相互作用する細胞内因子の報告もある。まさに、Vpr 蛋白の機能はその 3 次元構造と結合する細胞内因子によって制御されているといえる。従って、Vpr 結合性細胞内因子を同定することこそ、HIV-1 複製と AIDS 発症の制御機構の解明のために必須である。そこで、本研究では、我々が以前に同定した Vpr 結合性細胞内因子 SAP145 と Importin  $\alpha$  を介して制御される Vpr のスプライシングの阻害と核移行の発現機構の解析を行ったので報告する。

### B. 研究方法

- 1) pull-down assay : N末端側にGSTを持つ組換え型マウスimportin  $\alpha$  の野生型及び各種変位型をE. coli BL21(DE3)株で発現させ、glutathione (GSH)-Sepharose beadsにて回収した。一方、野生型及び各種変異型VprとGFPとの融合蛋白を*in vitro* translationで調製したもの、あるいは、野生型及び各種変異型Vpr発現ベクターをHeLa細胞に導入し24時間培養後の細胞抽出液を用いた。
- 2) 核移行解析 : Digitonin処理HeLa細胞を用いたnuclear import assayで行った。組換え型Imp  $\alpha$ の野生型と変位型をN末端側にGSTを持つ融合蛋白として大菌に発現させ、proteaseにてGSTを切断除去した。Vprの各ドメイン及びそれらの点変異体を、N末端側にGST、C末端側にGFPを持つ融合蛋白として調製した。
- 3) マクロファージ指向性感染性DNAクローンpNF462のVpr変位体の構築 : pNF462のNde IとSal Iの断片をpBluescript II SK<sup>+</sup>にsubcloningし、PCR direct mutagenesis 法によってVprのスタートコドンATGをGTGに変換した。この遺伝子を含むNde IとSal Iの断片をpNF462のApa IとSal IIに入れ替え、vpr欠損pNF462を作製した。各種Vpr変異体を有するpNF462も作製した。これらをCOS7細胞にリポフェクション法で導入、ウイルス量をELISA法で測定し、感染性をMAGIC-5法で確認した。
- 4) マクロファージに対するウイルス感染実験 : 健康なドナーから採取した末梢血リンパ球を遠心分離後、さらにカラム

に通してCD14分子陽性の未分化マクロファージを単離し、GM-CSFで刺激して2週間培養後、分化したマクロファージを準備した。これらに各種pNF462をCOS7細胞に導入して得たウイルスを感染させた。培養上清中のp24抗原量の変化を抗-p24抗体を用いたELISA法にて測定した。

## C. 研究結果

### (1) Vpr の核移行機序の解析:

1) Vpr の核移行に重要な importin  $\alpha$  のドメイン解析:

以前に我々は、Vpr は 2 つの  $\alpha$ -helix ドメインの内、 $\alpha$ H2 と FG リピートを有する nucleoporin との相互作用を介して核膜に結合後、 $\alpha$ H1 の働きにより核内へと移行することを明らかにした。アダプター分子 importin  $\alpha$  のみを介して核移行が促進される蛋白質は Vpr が初めてであることから、Vpr と importin  $\alpha$  による新規の核移行機序を明らかにするために、核移行に関与する Imp  $\alpha$  のドメイン解析を行った。Imp  $\alpha$  は N 末から順に、Imp  $\beta$  binding (IBB) ドメイン、NLS 認識領域であるアルマジロ構造、CAS 結合ドメインを有する (図 1A)。そこでこれらの機能ドメインを欠損した 6 種類の変異体を精製し、それらを用いた *in vitro* Nuclear Import assay を行った (図 1B)。IBB ドメイン欠失変異体を加えた場合は、importin  $\alpha$  を加えない場合と同様に、Vpr の強い核膜局在が観察された。一方、CAS 結合領域のみ (393-462, 393-529) では、野生型 Vpr とほぼ同じ様な核移行能を示した。以上の結果から、Vpr の核移行には importin  $\alpha$  の CAS 結合ドメインが必要であることが明らかとなった。

次に、Vpr と importin  $\alpha$  との相互作用を確認するために、同じ変異体を用いて pull-down assay を行った (図 1C)。Vpr の核移行に重要であった CAS 結合ドメインでは Vpr との結合が見られず、Vpr の核移行に関与しなかった IBB ドメインで Vpr との結合が見られた。以上の結果から、Vpr は、核移行に関与する CAS 結合ドメインではなく、IBB ドメインと直接的に結合することが明らかとなった。更に、Imp  $\alpha$  と結合する Vpr 側のドメイン解析を Vpr 発現細胞抽出液を用いた pull down assay で解析した (図 1D)。上述の解析で Imp  $\alpha$  と直接結合を示さなかった  $\alpha$ H2 が Imp  $\alpha$  と間接的な結合を示した。これらの結果から、核移行には CAS 結合ド

メインが必要であり、この過程は Vpr とある種の細胞内因子を介した Imp  $\alpha$  との間接結合を介して行われる可能性が示唆された。

2) Vpr の核移行に関与する importin  $\alpha$  の isoform の解析:

importin  $\alpha$  には複数の isoform が存在するが、それらは 3 つのサブファミリーを形成しており、それぞれ約 50% のアミノ酸相同性がある。まず、Vpr の核移行に必要なヒト isoform を *in vitro* nuclear import assay を用いて同定した (図 2A)。3 つの isoform、Rch1、Qip1 及び NPI-1 の内、Rch1 と NPI-1 により核移行が促進された。その効果は Rch1 の方が強かった。更に、これらの isoform がマクロファージに発現しているか否かを各 isoform を特異的に認識するプライマーを用いた定量的 RT-PCR により解析した (図 2B)。M-CSF で分化させたマクロファージにおいて、HIV-1 感染の有無にかかわらず、3 つの isoform の発現が認められた。また、それらの発現量は活性化 CD4T 細胞、HeLa 細胞、Jurkat 細胞と同レベルであった。以上のことから、Vpr の核移行は実際にマクロファージにおいて、Rch1 及び NPI-1 により優位に促進される可能性が考えられた。

3) 感染性 DNA クローン pNF462 のマクロファージに対する感染実験:

HIV-1 のマクロファージ感染における Vpr の核移行の意義を調べるために、G2 期 arrest、アポトーシス、核移行能が著しく減弱した Vpr 変異体を感染性分子クローン NL432 の vpr 遺伝子の N 末に最も近い  $\alpha$ -helix ドメイン、leucine-zipper 様ドメイン及び C 末の arginine-rich ドメインをコードする領域に変異を導入して得た。それらの vpr 遺伝子を有するマクロファージ指向性感染性 DNA クローン pNF462 を構築し、COS7 細胞に導入して、ウイルスを産生させた。次に、健康なドナーから準備した GM-CSF で分化させたマクロファージに感染させ、ウイルス量の変化を感染後 18 日まで測定した。野生型ウイルス及び G2 期 arrest 能、アポトーシス能の減弱した Vpr 蛋白を有する変異ウイルスを感染させた場合では、顕著なウイルス産生が確認されたが一方、Vpr 欠失ウイルス及び核局在を消失した Vpr 蛋白を有する変異ウイルスではウイルスが殆ど産生されなかった。以上の結果から、Vpr の核局在能がマクロファージにおける HIV-1 の感染に対して重要であることが明らかとなった。

### (2) Vpr によるスプライシングへの影響

1) Vpr と SAP145 との相互作用の解析

最近申請者らは、yeast two-hybrid 法を

用いて Vpr 結合性細胞内因子の単離を試み、これまでに報告のなかった SAP145 を見出した。SAP145 は、スプライシングの際、mRNA 前駆体のブランチ部位に結合する U2snRNP に含まれる splicing factor 3b (SF3b) を構成する分子であることから、Vpr との相互作用によりスプライシングに何らかの影響が及ぼされるものと予想される。

そこで、細胞内での Vpr と SAP145 の結合作用を解析した。HeLa 細胞を用い強制発現させた Vpr を免疫沈降した結果、SAP145 の共沈が観られた。このことから Vpr と SAP145 の相互作用が酵母を用いた場合と同様にヒト細胞でも確認できた。次に SAP145 との結合に必要な Vpr 側のドメインの同定を試みた。Vpr は 96 アミノ酸残基からなる分子で 5 つのドメインに分けられるが、その中でも機能の発現に関与する 2 つのおよびのアルギニンに富む領域 (77-96 位) を GFP に連結し、HeLa 細胞で同様に免疫沈降を行った。その結果、SAP145 は 77-96 領域でのみ相互作用することが明らかとなった。また、Vpr の C 末端欠失変異体で同様に実験したところ SAP145 との相互作用は検出されなかった。このことから Vpr と SAP145 との相互作用は、Vpr の C 末端領域を介して起こることが推測された。

#### 2) Vpr による $\alpha$ -globin mRNA 前駆体のスプライシングへの影響

SAP145 はスプライシング関連タンパク質であることから、 $\alpha$ -globin mRNA 前駆体を材料としてそのスプライシングにおける Vpr の阻害効果を RT-PCR 法で調べた。イントロン 1 特異的プライマーを用い、nested-PCR を行った結果、Vpr および C81 導入によりバンドが検出された。また、H2 領域および 77-96 領域を導入した場合でも同様のバンドが検出された。このバンドをクローニングし、塩基配列を決定した結果  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体からイントロン 2 のみがスプライシングにより除去された分子であることが明らかとなった。一方、mock およびコントロールベクター導入細胞ではイントロンを含むバンドは検出されなかった。これらのことから Vpr は、 $\alpha$ -globin mRNA 前駆体のイントロン 1 に対してそのスプライシングを阻害する作用があることが明らかになった。またこの阻害作用は、Vpr の C 末端領域に関与する現象であることが示唆された。

#### D. 考察

これまでに T 細胞に対する HIV-1 の感染と増殖に関しては Vpr の G2 期 arrest 能 が

重要であるという報告がなされていた。本感染実験の結果から、マクロファージにおける HIV-1 の感染には、Vpr の G2 期 arrest およびアポトーシス機能ではなく核局在能が重要であることが証明された。importin  $\alpha$  の isoform、Rch1、Qip1 及び NPI-1 の内、Rch1 と NPI-1 により Vpr の核移行が促進されること、さらにそれらの発現が M-CSF で分化させたマクロファージ、及び PHA で刺激したマクロファージにおいて、HIV-1 感染の有無にかかわらず、認められた。それらの発現量は活性化 CD4T 細胞、Jurkat 細胞などと同レベルであった。以上の結果から、マクロファージにおける HIV-1 感染において、Vpr の核移行が重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

本研究において我々は、Vpr の新しい機能としてスプライシングの阻害効果を発見した。即ち Vpr の過剰発現によって  $\alpha$ -globin mRNA 前駆体からのイントロン 1 のスプライシングが阻害されることを見いだした。この阻害効果は Vpr の C 末端 77-96 領域を導入した場合にも認められた。さらに、免疫沈降において Vpr および 77-96 領域は SAP145 と相互作用することがヒト細胞で確認できた。これらの結果から、Vpr のスプライシング阻害効果は Vpr が C 末端領域を介して SAP145 と相互作用する結果である可能性が考えられた。今後は Vpr によるスプライシング阻害における RNA の配列特異性の有無、スプライシング阻害作用とこれまでに知られた Vpr の機能との相関および 30 種類以上あるとされる HIV-1 mRNA のスプライスパターンの形成における Vpr の意義について解析していきたい。

#### D. 結論

1. Vpr は N 端側に存在する  $\alpha$ -helix ドメインと importin  $\alpha$  の CAS 結合ドメインとの間接結合を介して核移行する。
2. Vpr の核移行能がマクロファージにおける HIV-1 感染に必須である。
3. importin  $\alpha$  の isoform の内、Rch1 により Vpr の核移行が最も促進された。また、Rch1 は M-CSF で分化させたマクロファージにおいて高レベルで発現していた。
4. Vpr と相互作用する細胞内因子としてこれまでに報告のなかった SAP145 を見出した。
5. Vpr の新しい機能としてスプライシングの阻害効果を発見した。

#### E. 研究発表

#### 1) 論文発表

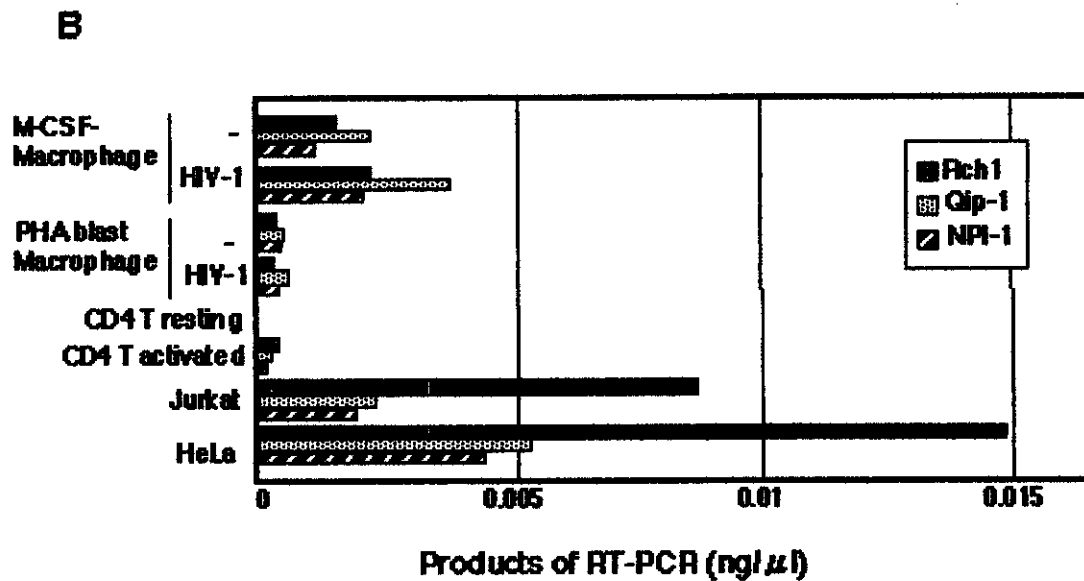
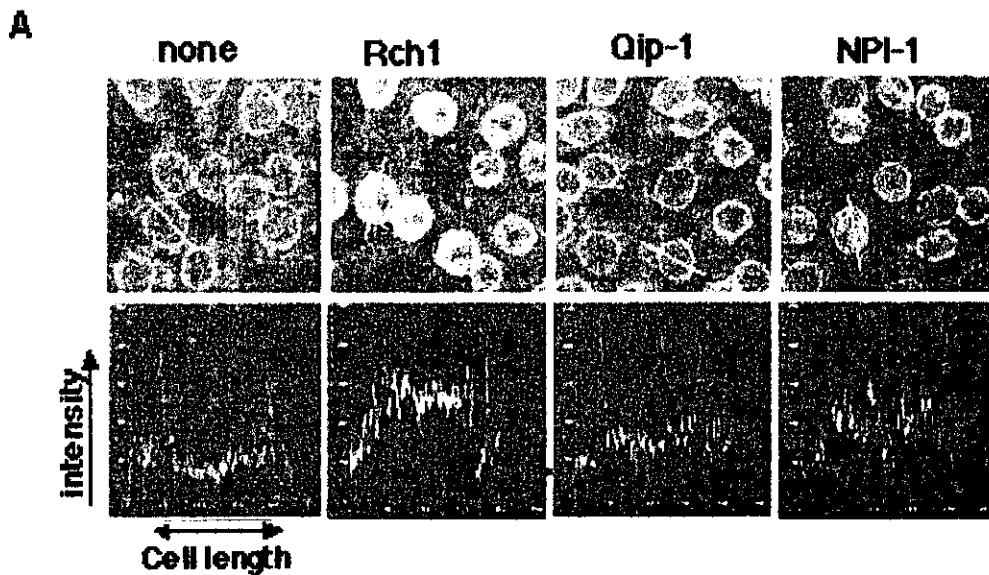
1. Takeshima S., Ikegami M., Morita M., Nakai Y. and Aida Y. Identification of new bovine BoLA-DRB3 alleles by sequence-based typing, *Immunogenetics*, 53:74-81, 2001.
2. Yasuda, J., Miyao, T., Kamata, M., Aida, Y. and Iwakura, Y. T cell apoptosis causes peripheral T cell depletion in mice transgenic for the HIV-1 vpr gene. *Virology*, 285: 181-192, 2001.
3. Tana, Watarai S., Aida Y., Tajima S., Kaikidani H., Onuma M. and Kodama M. Growth inhibition of cancer cells by co-transfection of diphtheria toxin A-chain gene plasmid with bovine leukemia virus-Tax expression vector, *Microbiol Immunol.*, 45:447-455, 2001.
4. Tajima, S., and Aida, Y. Mutant Tax protein from bovine leukemia virus with ability to activate the expression of *c-fos*. *J. Virology*, 76:2557-2562, 2002.
5. Tajima S., Takahashi, M., Takesima S., Konnai S., Watarai S., Yin S, Tanaka Y., Onuma M., K. Okada and Aida Y. A mutant form of the Tax protein of bovine leukemia virus (BLV) with enhanced transactivation activity, increases the expression and propagation of BLV invitro but not in vivo. *J. Virology*, 77:1894-1903, 2003.
6. Tajima S., Tsukamoto M., and Aida Y. Latency of viral expression in vivo is not related to CpG methylation in the U3 and part of the R region of the long terminal repeat of bovine leukemia virus. *J. Virology*, in press.
7. Konnai S., Takesima S., Tajima S., Yin SA., Okada K., Onuma M. and Aida Y. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection., *Microbiol. Immunol.*, in press.
8. Kamata M., and Aida Y. Retardation of cell growth by human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated bystander effect., submitted.
9. Kamata M., Miyamoto M., Yoneda Y., and Aida Y. Importin  $\alpha$  promotes through nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type-1 Vpr as independent manner of importin  $\beta$ ., submitted.
10. Azunma A. and Aida Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle arrest at the G1 phase and apoptosis via disruption of mitochondrial function in rodent cells., submitted.

#### 2) 学会発表

1. 我妻昭彦、間陽子(2002)：齧歯類細胞を用いた HIV-1Vpr が誘導するアポトーシス機構の解析、第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10 月
2. 倉光球、蒲田政和、我妻昭彦、橋爪智恵子、間陽子(2002)：HIV-1Vpr による  $\alpha$ -globin2 pre-mRNA のスプライシング阻害の解析、第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10 月
3. HIV-1 Vpr と相互作用する細胞内因子の解析、橋爪智恵子、倉光球、蒲田政和、磯貝まや、我妻昭彦、間陽子(2002)：第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10 月
4. 飯島沙幸、庄文忠、横田恭子、三輪正直、間陽子：HIV-1Vpr 遺伝子の機能とマクロファージ感染、第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10 月
5. 仁田原優子、蒲田政和、間陽子(2002)：HIV-1Vpr の核移行に関する Importin  $\alpha$  の機能ドメインの解析、第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10 月
6. 間陽子、蒲田政和、我妻昭彦 (2002)：HIV-1Vpr による p21 の up-regulation と抗アポトーシス活性の相関、第 50 回日本ウイルス学会、札幌、10 月
7. 我妻昭彦、間陽子(2002)：細胞内 HIV-1Vpr が誘導する G1 期 arrest を介したアポトーシス機構の解析、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11 月
8. 橋爪智恵子、倉光球、蒲田政和、磯貝まや、我妻昭彦、間陽子(2002)：新規 HIV-1 Vpr 結合蛋白 SAPI45 の解析”、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11 月
9. 倉光球、蒲田政和、我妻昭彦、橋爪智恵子、間陽子(2002)： $\alpha$ -globin2 pre-mRNA を用いた HIV-1Vpr によるスプライシング阻害の解析、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11 月
10. 仁田原優子、蒲田政和、間陽子(2002)：Importin  $\alpha$  による HIV-1Vpr の核移行に関する解析、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11 月
11. 間陽子、蒲田政和、我妻昭彦(2002)：HIV-1Vpr の抗アポトーシス活性と p21 の up-regulation、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11 月
12. 飯島沙幸、庄文忠、横田恭子、三輪正直、間陽子(2002)：マクロファージ感染における HIV-1vpr 遺伝子の機能、第 16 回日本エイズ学会、名古屋、11 月

#### F. 特許の出願

「カスパーゼ 9 活性化剤」、平成 14 年 8 月 2 日出願

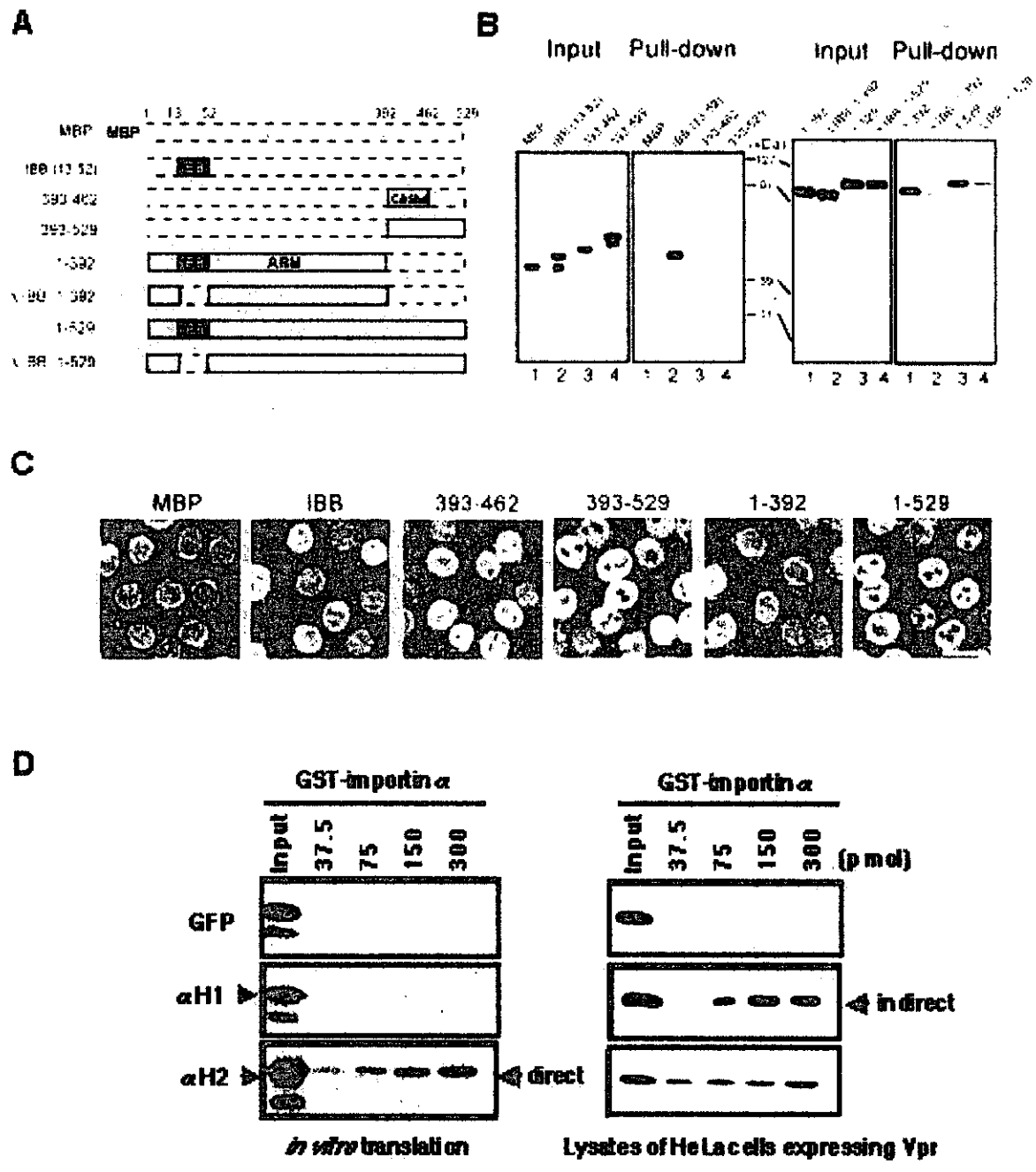


**Fig. 2 Nuclear import of Ypr via importin $\alpha$  isoforms which expressed in terminally differentiated macrophages.**

**A. *In vitro* nuclear import assay with GST-N1 7C74-GFP and importin $\alpha$  isoforms (Rch1, Qip-1 and NPI-1)**

**B. Expression of importin $\alpha$  Isoform mRNA**





**Fig. 1** Indirect interaction between the carboxyl terminal of importin  $\alpha$  and Ypr requires for nuclear entry of Ypr.

- A.** Deletion mutants of importin  $\alpha$  used in this study.
- B.** GST pull-down assays with GST-fused N17C74 and importin  $\alpha$  mutants.
- C.** *In vitro* nuclear import assays performed in the presence of derivatives of importin  $\alpha$ .
- D.** *In vitro* translation and GST pull-down assay added in lysates of HeLa cells expressing Ypr.

## 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

分担研究者 増田 貴夫 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学

### 研究要旨

GST インテグラーゼ(全長、各断片)蛋白を HeLa 細胞抽出液と反応させ結合する細胞性因子を SDS-PAGE, Western 法を用いた Pull-down アッセイにより検討した。その結果インテグラーゼと相互作用する細胞性因子として Rch-1, transportin, HSP70, および Nupp62 を同定した。こうした因子の発現プロファイルを種々の細胞で調べ、ウイルス感染との関連性を検討した。その結果ヒト末梢血由来リンパ球においては Rch-1 の発現と HIV-1 感染との関連性が認められ、importin $\alpha$ のサブファミリーの一つである Rch-1 は HIV-1 感染成立に重要であることが示唆された。一方、単核球由来マクロファージ(MDM)では Rch-1 の発現は検出感度以下であったが HIV-1 感染性は非常に高かったことより、MDM においては、Rch-1 以外の宿主因子(transportin 等)の関与が考えられた。

### A. 研究目的

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

### B. 研究方法

- 1) pull-down アッセイ: GST インテグラーゼ(全長、断片)蛋白を HeLa 細胞抽出液と反応させ結合する細胞性因子を SDS-PAGE, Western 法により検討した。
- 2) 核内移行関連宿主因子の発現プロファイル  
種々のヒト細胞株(HeLa, MOLT-4, Raji, THP-1)及びヒト末梢血由来リンパ球(PBL)、単核球(PBMC)由来マクロファージ(MDM)から細胞質分画を調整し種々の核内移行関連宿主因子(Rch-1, Nip1, Qip1, importin $\beta$ , transportin, Ran, RanBP, Hsp70, Nupp62)の抗体を用いた Western blott 法により解析した。
- 3) HIV-1 の感染感受性は、シュドタイプウイルスによる single-round 感染系により評価した。

### C. 研究結果

- 1) Pull-down アッセイにより、インテグラーゼの中央ドメイン(51-210)が nucleoporin p62, と C-末端ドメイン(211-280)は Rch-1, importin $\beta$ , transportin, Hsp70 との結合を認めた。こうした細胞性因子との結合は全長インテグラーゼでは弱かった(図1)。
- 2) 核内移行関連宿主因子の発現プロファイル  
調べた限りのヒト細胞株(HeLa, MOLT-4, Raji, THP1)では、PMA 処理による THP-1 での Rch-1 の発現低下が認められた以外は大きく、いずれも発現量は高かった(図2)。一方、未刺激の PBMC および PBL では Rch-1 の発現が顕著に低かった。しかしながら、PBL を刺激後(PHA+IIL2) 24 時間には Rch-1 の発現の増強が認められた。MDM では Rch-1 およびそのアイソタイプである、Nip1, Qip1 の発現はいずれも検出感度以下であった(図2)。
- 2) HIV-1 の感染感受性との関連性(図3)  
未刺激の PBMC および PBL では感染が成立しないが、PBL を刺激後(PHA+IIL2) 24 時間では効率よい HIV-1 感染をみとめた。したがって、PBL に関しては Rch-1 の発現と HIV-1 感染との関連性が認められた。一方、PBMC を1週間ヒト血清存在下で培養することにより得られた MDM では依然 Rch-1 の発現は検出感度以下であったが HIV-1 感

染性は非常に高かった。

## D 考察

HIV-1 インテグラーゼの中央ドメイン (51-210) が核膜孔構成蛋白のひとつである nucleoporin p62 との結合を認めたことは importin  $\alpha/\beta$  以外の細胞性因子の関与あるいは直接、核膜孔に結合し、エネルギー依存的に核膜孔を通過する可能性が示唆された。また C-末端ドメイン (211-288) と Rch-1, importin $\beta$ , transportin, Hsp70 との結合を認めた。したがって importin $\beta$  を介した古典的経路の関与が示唆された。核内移行関連宿主因子の発現プロファイルと HIV-1 の感染感受性との相関性から PBL においては Rch-1 の発現と HIV-1 感染との相関性が認められた。したがって importin  $\alpha$  のサブファミリーの一つである Rch-1 は HIV-1 感染成立に重要であることが示唆された。しかしながら、MDM では Rch-1 の発現は検出感度以下であったが HIV-1 感染性は非常に高かったことより、MDM においては、Rch-1 以外の宿主因子 (transportin) の関与が考えられた。今後、各機能ドメインのウイルス複製における意義を検討する必要があると考えられた。そのために各関連因子の欠損細胞株の樹立が必要となる。我々は H1 プロモーターを挿入したレンチベクターによる RNAi 発現系を確立し、今後はこれらの手法を用い、各関連因子の HIV 複製過程における意義を検討する。

## E. 結論

インテグラーゼと結合する核内移行関連宿主因子として、Rch-1, transportin, HSP70 および Nup62 を同定した。核内移行関連宿主因子の発現プロファイルと HIV-1 の感染感受性との相関性から Rch-1 は HIV-1 感染成立に重要であることが示唆された。しかしながら、MDM においては、Rch-1 以外の宿主因子 (transportin 等) の関与が考えられた。

## F. 研究発表

### [論文発表]

1) Nishitsuji H., Ikeda T., Miyoshi H., Ohashi T., Kannagi M., and Masuda T. Expression of siRNA by lentiviral-based vector confers efficient antiviral state on primary human cells (submitted).

2) Hasegawa A., Ohashi T., Hanabuchi S., Kato H., Takemura F., Masuda T., and Kannagi M. Expansion of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) reservoir in orally infected rats: Inverse correlation with HTLV-I-specific cellular immune response. *J. Virol* (in press).

3) Ohashi T., Hanabuchi S., Suzuki R., Kato H., Masuda T., and Kannagi M. Correlation of major histocompatibility complex class I downregulation with resistance of human T-cell leukemia virus type I-infected T cells to cytotoxic T-lymphocyte killing in rat model. *J. Virol.* 76:7010-7019, 2002.

4) 増田貴夫 HIV-1 インテグラーゼの新たな機能: ウイルスゲノムの脱殻から組み込みまで。ウイルス 52:177-183, 2002.

### [学会発表]

1) Masuda T., "Functional Roles of the HIV-1 Integrase." U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 14<sup>th</sup> Joint Meeting of the AIDS Panels. (Seattle, USA), 2002.

2) 増田貴夫 "HIV-1 インテグラーゼ蛋白の核局在シグナルと細胞性因子の検討" 第 5 回白馬シンポジウム-最新エイズ研究 2002-(長野), 2002.

3) 増田貴夫 他六名 "HIV-1 インテグラーゼ核内移行関連細胞性因子の検討" 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌) 2002.

4) 池田たま子, 周 Xin, 長谷川温彦, 大橋貴, 奈良信雄, 神奈木真理, 増田貴夫 "HIV-1 インテグラーゼ変異体の機能解析" 第 50 回日本ウイルス学会学術集会 (札幌) 2002.

5) 池田たま子, 周 Xin, 長谷川温彦, 大橋貴, 奈良信雄, 神奈木真理, 増田貴夫 "HIV-1 インテグラーゼ変異体の機能解析" 第 16 回日本エイズ学会学術集会 (名古屋) 2002.

6) Masuda T., Tsusrutani N., Tamako Ikeda<sup>1</sup>, Nishitsuji H., Yamamoto N., Kannagi M. Functional aspects of HIV-1 integrase: from uncoating to integration of viral genome. 学会主催シンポジウム "HIV 複製素過程研究の最先端" (東京) 2002.

他 7

## G. 知的所有権の出願・取得状況

無し

## Pull-down assay using HeLa cell lysate

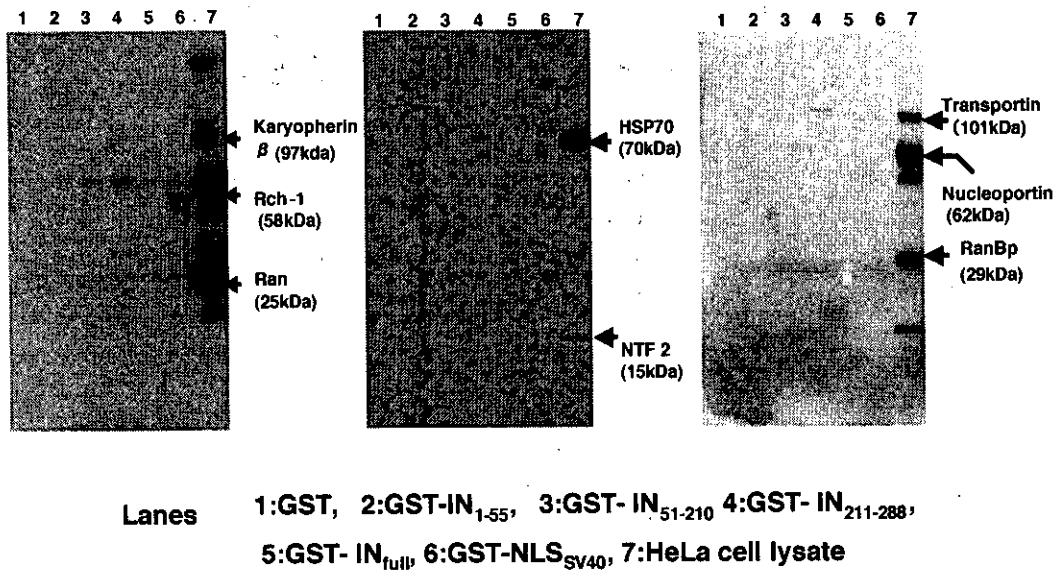


図1 pull-down アッセイによる HIV-1 インテグラーゼ各ドメインと結合する核内輸送因子の検討

## 核内輸送関連因子の発現プロファイル (細胞株)

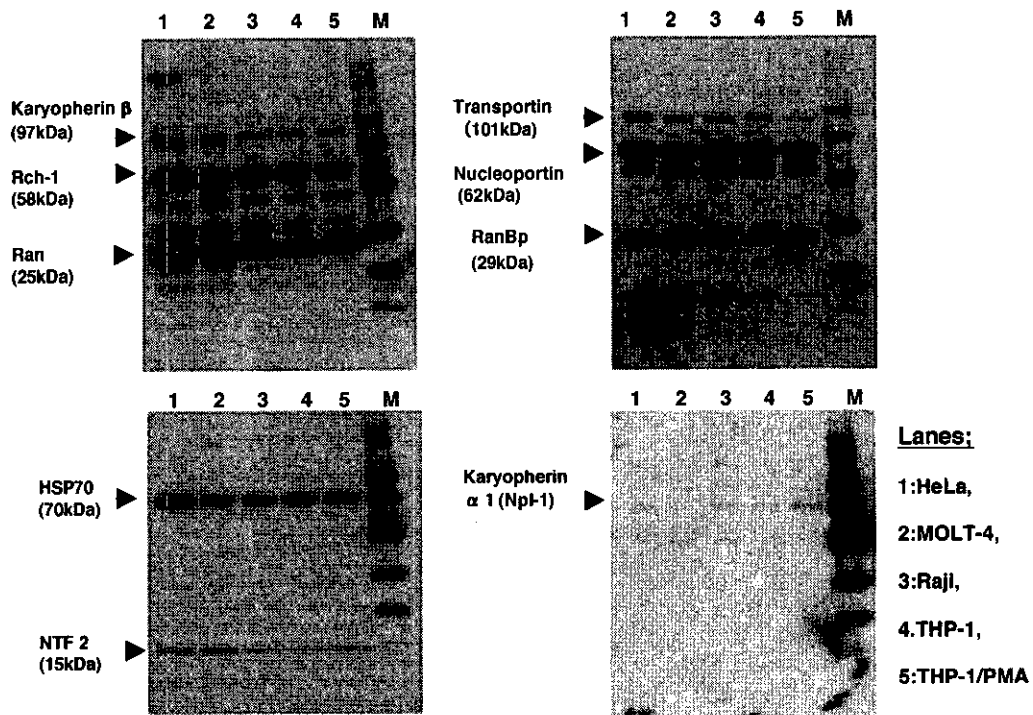


図2 核内移行関連宿主因子の発現プロファイル