

核内輸送関連因子の発現とHIV-1感染の相関
-primary cells from PBMC-

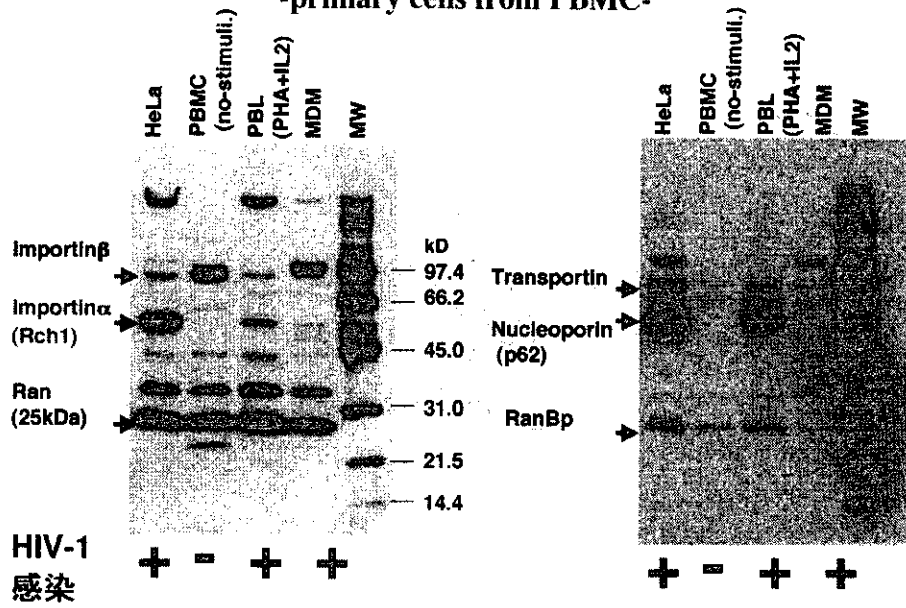


図 3 HIV-1 の感染感受性との相関性

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

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教授）
共同研究者 高田統夫、三田貴臣、楊 建平、朝光かおり、手塚俊文

研究要旨 以前に酵母 two-hybrid screening 法を用いて同定した NF- κ B の新規阻害因子 RelA-associated inhibitor (RAI)は強い HIV 複製阻害活性を示した。RAI は構成的に核に局在し、シグナルによって核に移行した NF- κ B と結合し、その活性を抑制するが、今回の研究結果より、RAI は NF- κ B の p65 サブユニットの DNA 結合活性のみならず、同じく HIV の転写活性化を担う Sp1 の DNA 結合能を強く抑制することによって著明な HIV 複製抑制効果を発揮することがわかった。

A. 研究目的

細胞内に潜伏するプロウイルスからの転写の段階での制御は HIV の増殖の律速段階速度であると考えられる。プロウイルスからの遺伝子発現は、主に宿主細胞の転写活性化因子 NF- κ B とウイルスのコードする Tat によって段階的に制御されている。潜伏感染細胞内ではウイルスの遺伝子発現は抑えられており、その初期の遺伝子発現は宿主因子によって誘導されると考えられることから、NF- κ B による HIV プロウイルス転写制御機構は HIV 感染者からのウイルス増殖の誘導に主要な役割を演じていると考えられる。多くの蛋白分子は蛋白分子間の相互作用によって制御されている。我々は NF- κ B の活性制御に関わる未知の宿主因子を分子間相互作用を用いた two-hybrid 法によって同定し遺伝子クローニングを試みた。

B. 研究方法

NF- κ B の p65(RelA)サブユニットの中央部分をベイトに用いてヒト胎盤および脳由来の cDNA library (Matchmaker, Clontech 社) で酵母 two-hybrid screening を実施した。得られたクローンのプラスミッドを精製し、p65 との相互作用を酵母細胞内で確認した後、遺伝子配列を決定した。未知の遺伝子の場合には、組み換え蛋白を作成し *in vitro* pull-down assay を行って相互作用を確認した。また、生細胞内(*in vivo*)での相互作用は FLAG エピトープを標識した蛋白を細胞内で発現させ、FLAG 抗体で免疫沈降後ウェスタンブロットで p65 蛋白が共に複合体の一部として沈殿するかを確認した。なお、細胞内局在は GFP

との融合蛋白発現ベクターを作成し細胞内に導入して調べた。NF- κ B 依存性遺伝子発現に対する効果は、 κ B モチーフを持つシフェラーゼ発現ベクターや p65 サブユニット発現ベクターとともに細胞内に導入して定量的に検定した。また、NF- κ B(p65)の DNA 結合に及ぼす効果については遺伝子導入細胞より核抽出液を調整し EMSA 法によって検定した。RAI の抗ウイルス活性は 293 細胞に完全長の HIV-1 クローンを含むプラスミッド pNL4-3 を導入しその培養上清中もしくは細胞破碎液中のウイルス抗原を RETRO-TEK HIV-1 p24 Antigen ELISA kit (Zepto Metrix Corp.) を用いて測定することによった。

C. 研究結果

(1) RAI の同定：p65 サブユニットの中央部分をベイトとして、これと結合する蛋白の遺伝子クローニングを酵母 two-hybrid 法を用いて実施した。約 3×10^6 個の cDNA クローンから新たな遺伝子 RelA-associated inhibitor(RAI)(特許申請中)を同定した(Yang et al, J. Biol. Chem. 1999)。

(2) RAI による HIV-1 LTR からの遺伝子発現の抑制機構:RAI による HIV-1 LTR の遺伝子発現に対する効果を見たところ、RAI は完全長の HIV-1 LTR を含む CD12-Luc の転写レベルを未刺激の条件下でも容量依存的に抑制する傾向を示した。mutant ではこの抑制は見られなかった。RAI はヘルペスウイルス tk プロモーターや p21 遺伝子のプロモーターなど他の遺伝子のプロモーター活性は抑制しなかった。生理的 NF- κ B 活性化

因子 TNF- α などで HIV-1 プロモーターを活性化させたところ、RAI は I κ B と比較して強力にその遺伝子発現を抑制した。HIV-1 LTR のシスエレメントのうち RAI による転写の抑制にいずれが関わっているかを検索するため、種々の 5'末端側の欠失ミュータントを用い RAI の作用を検討した。その結果、-117 より上流にある AP1, Myb, NFAT-1 の結合領域は RAI による転写の抑制には関わっていないことが明らかとなった。他方、NF- κ B 部位を持たない CD52-Luc を用い同様の実験を行ったところ、TNF による活性化も I κ B による転写の抑制も見られなかったが、RAI によって転写が抑制された。また、Sp1 の過剰発現により CD52-Luc の転写は約 3.5 倍に増強されたが、この転写活性化は RAI により完全に抑制された。さらに Sp1 領域を持たない CD54-Luc を用いたところ、RAI による転写の抑制は見られなくなった。これらのことから、RAI は NF- κ B 誘導型の転写のみならず、Sp1 による構成的な転写をも抑制しうることが示された。

(3) RAI による p65 および Sp1 の DNA 結合への直接的な抑制:RAI が核に局在し、NF- κ B の p65 subunit と相互作用を示し、RAI を過剰発現させた細胞では NF- κ B の DNA 結合が阻害され NF- κ B 結合領域をプロモーター領域に持つ遺伝子の発現を抑制することは以前の論文で報告されている(Yang et al., 1999)。しかしながら、RAI による HIV-1 遺伝子の発現の抑制が RAI と p65 の直接的な相互作用によるものなのか、他の細胞内の因子を介しているのか明らかではなかった。そこで RAI が NF- κ B の p65 および p50 サブユニット、AP1, Sp1 のそれぞれの DNA 結合活性を直接的に阻害するのかについて検討した。大腸菌で組換え蛋白 GST-RAI, GST-I κ B, および MBP-p65 を精製し、GST-RAI と GST-I κ B の MBP-p65 の DNA 結合活性に対する影響を κ B 配列を含む DNA プローブを用いたゲルシフト法により評価した。MBP-p65 による DNA 結合は GST-RAI または GST-I κ B で効率よく抑制されたが、GST 単独では抑制は見られなかった。ついで、p50, AP1, および Sp1 の DNA 結合に及ぼす GST-RAI の影響を検討した。p50 と AP1 の DNA 結合活性を RAI は抑制しなかったが、RAI は Sp1 の DNA 結合活性を強力に容量依存的に抑制した。

(4) in vitro での RAI と Sp1 の相互作用:次に、RAI が in vitro で Sp1 と直接結合するかを in vitro で検討した。グルタチオンセファロースビーズに吸着させた GST または GST-RAI を組換え Sp1 または p65 蛋白とともに反応させた。洗浄後その結合蛋白について SDS-PAGE および抗 Sp1 抗体もしくは抗 p65 抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって解析した結果、Sp1 は RAI と in vitro で相互作用を示したが、p50 や AP1 との間には結合は見られなかった。

(5) RAI と Sp1 の細胞内局在:RAI と Sp1 が細胞中で同時に核内に局在しているかどうかを免疫染色法を用い観察した。pEGFP-RAI の導入から 24 時間後に細胞を固定し、抗 Sp1 抗体を用い染色した。RAI と Sp1 はともに核に局在し同様のパターンを示した。さらに、TNF- α による刺激下でも RAI は Sp1 とともに核に局在していた。

(6) RAI と Sp1 の in vivo での相互作用:293 細胞に FLAG 標識 RAI, またはそのミュータントを発現するプラスミドを導入し、その細胞破碎液を抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫複合体を回収し SDS-PAGE および抗 Sp1 抗体を用いたウェスタンブロッティング法にて免疫複合体中の Sp1 の検出を行った。293 細胞中には Sp1 が多く発現しているため、Sp1 を過剰発現させる必要はなかった。Sp1 は完全長 RAI を強制発現した細胞破碎液中に共沈していた。さらに、RAI のどの部位が Sp1 との相互作用に関わっているかについて検討した。完全長 RAI, RAI の N 末端側、および RAI の C 末端側を発現させたところ、Sp1 はアンキリンリピートや SH3 ドメインを含む C 末端側と結合することが明らかとなった。

(7) RAI による HIV-1 の複製の抑制:RAI の HIV-1 の複製に対する影響を検討するため、ウイルス複製能をもつ完全長 HIV-1 クローン (pNL4-3) とさまざまな量の RAI (完全長, N 末端側, および C 末端側) 発現プラスミドを 293 細胞に導入した。293 細胞は HIV-1 受容体を持たないので、完全長クローンから複製された HIV-1 は再感染しない。ここでは、潜伏感染細胞からのウイルス複製に対する効果を見るために、NF- κ B により遺伝子発現が増強した際の RAI の HIV-1 の複製に及ぼす影響について見た。pNL4-3 を pCMV-p65 とともに導入することにより細胞培養上清中には約 16

倍の HIV-1 の増殖が見られた。しかし、完全長 RAI を発現させると HIV-1 の増殖は容量依存的に著明に抑制された。他方、RAI の変異体を強制発現させても、抑制は見られなかった。

D. 考察

本研究では、RAI が NF- κ B の p65 subunit のみならず Sp1 に対しても直接相互作用し、それらの DNA 結合を阻害し、転写活性を抑制することが明らかとなった。このような作用により、RAI は実際に NF- κ B と Sp1 が主要な役割を果たしている HIV-1 のようなプロモーターの作用を効率よく抑制することが初めて明らかになった。RAI は、Sp1 と相互作用する既知の他の因子との類似性はなく、それゆえ RAI の Sp1 に対する作用は予想外のものであった。Sp1 を阻害する因子についてはこれまでもいくつか報告がある。たとえば、Vallian らは PML (promyelocytic leukemia protein) が Sp1 と相互作用を示しその転写活性を抑えることを報告している。同様に Chen らも網膜芽細胞腫関連 20 キロダルトン蛋白 Sp1-I により Sp1 の DNA 結合とその転写活性を抑えることを報告している。その他、von Hippel-Lindau 遺伝子産物 (VHL) は Sp1 の転写活性は抑制するが DNA 結合は抑制しない。これらのことから、Sp1 は PML, Sp1-I, VHL, p107, および RAI といった多くの制御因子との相互作用によって厳密にコントロールされている。

HIV-1 の遺伝子発現や複製に正の制御因子として Sp1 と NF- κ B が協調的に作用していることはこれまでも報告されている。実際、Perkins らは Sp1 と NF- κ B が直接相互作用をしていることを見出している。HIV-1 の遺伝子発現におけるこれらの転写因子の共役作用はプロモーター領域に互いに隣接して結合することによっても考えられており、このことから、RAI はその相乗性をも阻害している可能性がある。Sp1 が他の転写因子と共役作用を示すことの報告は多い。たとえば、LDL 受容体遺伝子のプロモーターからの転写の活性化の際に、Sp1 と SREBPs (sterol-responsive element-binding proteins) は転写コアクチベーターである CBP を必要とする。同様の現象は TNF- α のプロモーターでも見られる。NF- κ B も CBP/p300 を転写活性化の際必要とするので、Sp1 の共役作

用にも CBP/p300 が関わっている可能性がある。

RAI は NF- κ B と Sp1 により調節されている遺伝子の発現を強力に抑制する作用を持つことが今回の研究より明らかになったが、それゆえ、その転写抑制の標的遺伝子は組み合わせ効果によりむしろ限定される。RAI は心臓や胎盤といった比較的限られた組織でのみ発現しているため、この抑制作用もまた限定された組織のみで見られるものと考えられる。たとえば炎症性サイトカインである TNF- α や炎症のエフェクター遺伝子であるシクロオキシゲナーゼ-240) のプロモーター領域には NF- κ B や Sp1 結合配列が存在し実際これらの転写因子の調節を受けている。したがって TNF- α やシクロオキシゲナーゼ-2 による炎症性反応はこれらの組織では強く抑制されていることが考えられ、これが RAI の生理学的意義である可能性がある。

他方、RAI は CD4 陽性 T リンパ球やマクロファージといった通常 HIV-1 が感染するといわれている細胞では恒常的には発現していない。しかしながら、RAI 遺伝子を誘導すれば HIV-1 の転写を選択的に阻害し HIV-1 の複製に対する抵抗性を細胞に与える可能性がある。また、RAI 遺伝子のプロモーター領域の DNA 配列はまだ明らかとはなっていないが、RAI 遺伝子の特異的な制御因子や活性化因子が同定されれば、内因性の RAI を発現させることにより宿主の一定の組織中の細胞で複製を開始している HIV-1 遺伝子の発現を抑制することが可能になるかもしれない。さらに、RAI の立体構造と NF- κ B や Sp1 との複合体構造の解析により、これらの HIV 複製の律速段階である転写活性化の効率の良い阻害剤を開発するための重要な情報が得られることが大いに期待される。

E. 結論

以上、RAI は核内において NF- κ B のみならず Sp1 に対してもその DNA 結合活性を直接的に阻害し、これらの転写因子によって調節されている遺伝子の発現を強力に抑制する。実際に、これらの転写因子が重要な役割を果たしている HIV-1 の増殖を RAI は効率よく抑制できた。今後、RAI の立体構造やプロモーター領域の解明、発現制御機構の解析などが進めば HIV-1 の増殖を効率よく抑制する抗 HIV 薬の開発につながる可能性がある。

F. 研究発表 (英文原著論文)

- Takada, N., Sanda, T., Okamoto, H., Yang, J.-P., Asamitsu, K., Sarol, L., Kimura, G., Uranishi, H., Tetsuka, T., Okamoto, T. : RelA-associated inhibitor blocks transcription of human immunodeficiency virus type 1 by inhibiting NF- κ B and Sp1 actions. *J. Virol.* 76: 8019-8030, 2002
- Sarol, L.C., Imai, K., Asamitsu, K., Tetsuka, T., Barzaga, N.G. and Okamoto, T. : Inhibitory effects of IFN- γ on HIV-1 replication in latently infected cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291: 890-896, 2002
- Takahashi, N., Tetsuka, T., Uranishi, H., Okamoto, T. : Inhibition of NF- κ B Transcriptional Activity by Protein Kinase A. *Eur. J. Biochem.* 269 : 4559-4565, 2002
- Jiang, X., Takahashi, N., Matsui, N., Tetsuka, T., Okamoto, T.: The NF-kappaB activation in the lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J. Biol. Chem.* 278: 919-926, 2003
- Jiang, X., Takahashi, N., Ando, K., Otsuka, T., Tetsuka, T., Okamoto, T. : NF-kappaB p65 transactivation domain is involved in the NF-kappaB-inducing kinase (NIK) pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301: 583-590, 2003
- Matsumoto, S., Imaeda, Y., Umemoto, S., Kobayashi, K., and Okamoto, T.: Cimetidine increases survival of colorectal cancer patients with high levels of sialyl Lewis-X and sialyl Lewis-A epitope expression on tumor cells. *Br. J. Cancer*, 86:161-167, 2002.
- Maki, M., Matsukawa, N., Yuasa, H., Otsuka, Y., Yamamoto, T., Akatsu, H., Okamoto, T., Ueda, R., Ojika, K. : Decreased expression of hippocampal cholinergic neurostimulating peptide precursor protein mRNA in the hippocampus in alzheimer's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61: 176-185, 2002
- Tozawa, K., Okamoto, T., Hayashi, Y., Sasaki, S., Kawai, N., Kohri, K. : N-acetyl-L-cysteine enhances chemotherapeutic effect on prostate cancer cells. *Urol Res.* 30:53-58, 2002
- Watanabe, N., Ando, K., Yoshida, S., Inuzuka, S., Kobayashi, M., Matsui, N., Okamoto, T. : Gene expression profile analysis of rheumatoid synovial fibroblast cultures revealing the overexpression of genes responsible for tumor-like growth of rheumatoid synovium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294: 1121-1129, 2002
- Okano, A., Usuda, N., Furihata, K., Nakayama, K., Tian, Q B., Okamoto, T., Suzuki, T. : Huntingtin-interacting protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions. *Brain Res.* 2003 (in press)

10. T細胞サブセットと HIV-1 トロピズム

研究要旨 AIDS 病態進行とともに、HIV-1 のトロピズムが M-tropic (R5)から T-tropic (X4)へ変化するケースが多い。一方、HIV-1 感染者の CD38+ T 細胞の割合は病態進行とともに増加することも知られている。私たちは、CD4+ T 細胞を CD38 サブセットに分画後、それぞれが感受性を示す HIV-1 トロピズムを検討し、CD38+分画が X4 HIV-1 に、逆に CD38-分画が R5 HIV-1 に高感受性を示すこと、CD38+ T 細胞サブセットの X4 HIV-1 高感受性には自ら産生する IL-4 が関わっていることを明らかにした。本年度は、この X4 HIV-1 高感受性機序についてさらに検討を加え、ウイルス吸着・侵入、インテグレーション以降の、恐らく転写の過程で、両サブセット間で差異が生じていると考えられた。そこで、CD38-サブセットにおいて、IL-4 刺激後に誘導されると考えられる X4 HIV-1 転写抑制因子の同定に向け、条件検討を行った。

分担研究者 生田和良
(大阪大学微生物病研究所・教授)
協力研究者 木ノ本正信、直江真里
辻祥太郎
(大阪大学微生物病研究所)

A. 研究目的

AIDS 病態機序には、HIV-1 の主な標的細胞である CD4+ T 細胞のウイルス感受性（トロピズムと複製効率）が関わりと考えられる。

私たちは、AIDS 病態進行とともに、CD38+ T 細胞の割合が上昇する点に着目し、この CD38+と CD38- T 細胞サブセットが感受性を示す HIV-1 トロピズムについて検討してきた。その結果、CD4+CD38+ T 細胞サブセットは X4 HIV-1 に、逆に CD4+CD38- T 細胞サブセットは R5 HIV-1 に高感受性を示した。一方、CD4+CD38+と CD4+CD38-サブセットの表面抗原を比較した結果、CD4、CXCR4 発現には両サブセット間で差は認められなかったが、CCR5 陽性細胞の割合は CD38-サブセットでやや高かった。

次に、CD38+T 細胞サブセットにおいて X4 HIV-1 が高率に複製される機序について検討した。その結果、本 T 細胞サブセット自ら産生する IL-4 がこの X4 HIV-1 複製能の高さに

関わっていることを明らかにした。さらに、X4 HIV-1 感染後のインテグレーション効率を Alu-PCR 法により比較したところ、両サブセット間で顕著な差異は認められなかった。また、VSV-G-pseudotype HIV-1 ウイルスを用いた感染実験により、CD38+サブセットにおける X4 HIV-1 高感受性は CD38-サブセットよりも高い転写効率に依ると考えられた。本年度は、この X4 HIV-1 高感受性機序について検討を続けた。

B. 研究方法

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

各サブセットへのウイルス感染には、それぞれの分画 1×10^6 に対し、X4 HIV-1 (LAI, NL432) を 37°C、1 時間吸着させ、PHA (または IL-4)、IL-2 存在下で 3 日間、さらに IL-2 存在下で 8~9 日間培養を行った。また、両分画を PHA (または IL-4) であらかじめ 3 日間前処理した後に、同様の条件で HIV-1 感染した。ウイルス産生は、培養上清中の Gag p24 抗原検出 ELISA 法にて測定した。

また、VSV-G 発現ベクターと cotransfection

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

C. 研究結果

1) CD4+CD38+ T 細胞の X4 HIV-1 高感受性は、感染後に PHA もしくは IL-4 で 3 日間刺激を行うことにより認められた。次に、CD4+CD38+ および CD4+CD38- T 細胞サブセットを、あらかじめ PHA で 3 日間刺激を加えた後に X4 HIV-1 で感染したところ、CD38-であっても CD38+と同程度の高感受性 (ウイルス産生) を示した。あらかじめ 3 日間の PHA 刺激を受けることにより CD38-サブセットは CD38+に転じていた。一方、IL-4 で 3 日間刺激を加えた後に X4 HIV-1 で感染した場合は、CD38+サブセットは同様に高感受性を示したが、CD38-サブセットは高感受性を示さなかった。PHA と異なり、IL-4 刺激では CD38-は CD38+に転じなかった。

2) IL-4 刺激により誘導される STAT6 のリン酸化は、CD38+および CD38-の両サブセットで同程度に認められた。

3) CD38-サブセットは、X4 HIV-1 の感染、その後の IL-4 刺激により、インテグレーション効率 (Alu-PCR 法) は CD38+サブセットと同程度であったが、その後の転写・ウイルス産生効率は CD38+サブセットより顕著に低かった。そこで、この X4 HIV-1 感染した CD38-サブセットを IL-4 で 3 日間刺激した状態では、X4 HIV-1 は潜伏状態にあると考え、感染後 9 日目に PMA 刺激を行い、HIV-1 活性化を試みたが、活性化は認められなかつ

た。

4) CD4+CD38+および CD4+CD38-サブセットにおける、NF- κ B の活性化、Cyclin T1 の発現程度の比較をウェスタンブロッック法により試みたが、発現が両サブセットともに低く、検出不能レベルであった。

D. 考察

CD4+CD38+サブセットは X4 HIV-1 に高感受性であり、その機序として、本サブセット自ら高産生する IL-4 がウイルス産生の亢進に関わっていた。この高産生は、HIV-1 のレセプターおよびコレセプターの発現に関わるウイルス吸着・侵入段階の促進ではなく、少なくとも侵入以降の、IL-4 刺激により活性化される過程、恐らくインテグレーション後の転写過程の亢進に基づいていると考えられた。しかし、IL-4 刺激により誘導されと考えられる活性化 STAT6 は両サブセットで同程度に誘導された。したがって、CD38-サブセットにおいては、IL-4 刺激後に X4 HIV-1 の転写を妨げる因子が誘導されている可能性が高いと考えられた。

PHA であらかじめ 3 日間刺激することにより CD38-サブセットは CD38+に転じ、X4 HIV-1 に高感受性を示すようになったのに対し、IL-4 刺激では CD38 発現は陰性のままで、HIV-1 感受性も低いままであった。一方、X4 HIV-1 で感染した後の PHA 刺激では、IL-4 刺激の場合と同様に、ウイルス産生は起こらなかった。このように、細胞刺激剤として用いる PHA と IL-4 間では異なる宿主因子が関与し、また、ウイルス感染時期がその刺激の前か後かで異なる結果となった。IL-4 とは異なり、PHA には細胞分裂など他のさまざまな刺激も同時に加わっていると考えられる。したがって、IL-4 刺激では、CD38-サブセッ

トに X4 HIV-1 の転写を妨げる因子が誘導されるが、CD38-サブセットからは PHA 刺激を受けても自らの IL-4 産生能は低く、そのような HIV-1 転写抑制因子が誘導されないと考えられる。

もう1つの可能性は、X4 HIV-1 の転写に必要な因子が IL-4 刺激した CD38-サブセットでは誘導されず、また、感染後の PHA 処理でも誘導されず、PHA であらかじめ刺激した後に HIV-1 感染した場合にのみ誘導されることである。今のところ、上記のような2つの可能性が残されていると考えられる。

HIV-1 の主な標的と考えられる CD4+ T 細胞は、CD38 サブセットにより HIV-1 トロピズムが異なっており、CD38-サブセットにおいて X4 HIV-1 の転写を妨げる因子が誘導される可能性を考え、今後はその因子を試みたい。

E. 結論

HIV-1 の標的である CD4+ T 細胞のうち、CD38-サブセットは、IL-4 刺激により X4 HIV-1 の転写過程を妨げる因子を誘導することが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horikoshi, H., M. Kinomoto, T. Kurosu, S. Komoto, M. Shiraga, T. Otake, T. Mukai, and K. Ikuta. 2002. Resting CD4⁺ T cells with CD38⁺CD62L⁺ produce interleukin-4 which contributes to enhanced replication of T-tropic human immunodeficiency virus type 1. *Virology* 293:94-102.

Komoto, S., M. Kinomoto, H. Horikoshi, M. Shiraga, T. Kurosu, T. Mukai, W. Auwanit, T. Otake, I.

Oishi, and K. Ikuta. 2002. Ability to induce p53 and caspase-mediated apoptosis in primary CD4⁺ T cells is variable among primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18:435-446.

Tobiurne, M., K. Fujinaga, S. Suzuki, S. Komoto, T. Mukai, and K. Ikuta. 2002. Extracellular activates signal transduction pathway from Ras to mitogen-activated kinase cascades that leads to activation of human immunodeficiency virus from latency. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18:461-467.

Mukai, T., S. Komoto, T. Kurosu, J.A. Palacios, Y.-G. Li, W. Auwanit, M. Tatsumi, and K. Ikuta. 2002. Construction and characterization of an infectious molecular clone derived from the CRF01_AE primary isolate of HIV-1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 18:585-589.

Mukai, T., T. Kurosu, W. Auwanit, M. Tatsumi, and K. Ikuta. 2002. Construction and in vitro characterization of a molecularly cloned human immunodeficiency virus type 1 library. *Vaccine* 20:1181-1185.

Kurosu, T., T. Mukai, S. Komoto, M.S. Ibrahim, Y.-G. Li, T. Kobayashi, S. Tsuji, K. Ikuta. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 subtype C exhibits higher transactivation activity of Tat than subtypes B and E. *Microbiol. Immunol.* 46:787-799.

2. 学会発表

河本聡志、木ノ本正信、直江真理、辻祥太郎、大竹徹、生田和良。PBMC における HIV-1 誘導アポトーシス機序。第 16 回近畿エイズ研究会学術集会、2002。

河本聡志、木ノ本正信、直江真里、辻祥太郎、大竹徹、生田和良. HIV-1 感染 PBMC におけるアポトーシス誘導機序の解析. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会, 2002.

直江真里、Palacios Jose-Alejandro、河本聡志、木ノ本正信、辻祥太郎、生田和良. CD4+ T 細胞の CD38 サブセットと HIV-1 トロピズムについて. 第 16 回日本エイズ学会学術集会, 2002.

木ノ本正信、河本聡志、直江真里、辻祥太郎、大竹徹、生田和良. HIV-1 CRF01_AE 株のみに高率に認められる *vpu* 遺伝子欠損. 第 16 回日本エイズ学会学術集会, 2002.

Komoto, S., Kinomoto, M., Tsuji, S., and Ikuta, K. : Apoptosis-inducing ability is variable among primary isolates of HIV-1. 4th China-Japan International Congress of Virology, Kunming, China, 2002.

Ikuta, K., Palacios, J. A., Li, Y. G., Kinomoto, M., Naoe, M., Lai, W., and Tsuji, S.: CD4+T lymphocyte Subsets and HIV-1 Tropism. 12th IUSTI Asia-Pacific Congress on STI, HIV/AIDS, Beijing, China, 2002.

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

主任研究者 佐藤 裕徳 国立感染症研究所

研究要旨 HIV-1 Vpr はヒト、サル由来の培養細胞において細胞周期の G₂/M arrest を誘導する。この現象はマウス由来の細胞では見られないが、下等真核生物の分裂酵母においては認められる。今年度は、分裂酵母モデル系を用いた分子遺伝学的実験により、ヒト 14-3-3β が Vpr による G₂/M arrest の誘導に關与する可能性を示すことに成功した。さらに、Vpr による G₂/M arrest 誘導に対する感受性を種々の哺乳動物細胞で比較するため、Vpr と GFP を共発現するアデノウイルスベクターを構築した。これを各種哺乳動物由来の培養細胞に感染させたところ、ブタ、イヌ、キツネ、コウモリ、マウス、イルカの細胞では G₂/M arrest が見られないのに対し、ウシおよびネコ由来の培養細胞では明らかな G₂/M arrest が認められた。すなわち、従来言われていたヒト、サルに加えて、ウシやネコも Vpr による G₂/M arrest 誘導に感受性が示された。これら感受性を示す哺乳動物種はそれぞれを宿主とする免疫不全原性レンチウイルス（HIV、SIV、BIV、FIV）が同定されている点は興味深い。これらの知見は、Vpr による宿主細胞周期のかく乱機構や AIDS の発症機構におけるその意義を解明する上で有用であると考えられる。

分担研究者 増田 道明 獨協医科大学医学部・教授

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型（HIV-1）のアクセサリ蛋白 Vpr はヒトやサル由来の細胞の細胞周期を G₂/M 期で停止（arrest）させる。この機能は HIV-1 の複製に対して促進的に働くと考えられており、Vpr は抗 HIV 治療の有効な標的となる可能性もある。しかし、Vpr が G₂/M arrest を誘導するメカニズムについては不明の点が多い。

Vpr はヒトやサルだけでなく、下等真核生物である分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）においても G₂/M arrest を誘導する。分子遺伝学的解析に適した分裂酵母モデル系を用いた研究により、Vpr による G₂/M arrest の誘導には Wee1 や Rad24 等の宿主因子が必要であることが報告されている（Masuda et al., 2000）。また、ヒト WEE1 遺伝子は分裂酵母の *wee1* 遺伝子欠損を補完し、Vpr に対する感受性を賦与することが見出されている。今年度は、分裂酵母の *rad24* 遺伝子欠損を補完するヒト遺伝子を同定することを目的として実験を行った。

Vpr による G₂/M arrest はヒト、サル、分裂酵母など幅広い種で見られるが、マウス NIH 3T3 細胞では見られないという報告がある。従って、Vpr に対する感受性は種特異的に規定されていることが示唆されるが、その詳細は不明である。この点を明らかにするため、今年度の研究は、Vpr による G₂/M arrest 誘導に感受性を示すヒト、サル以外の哺乳動物種の有無を検討することも目的として行った。

B. 研究方法

GenBank に掲載されたヒト 14-3-3β mRNA の塩基配列に基づいてプライマーを作成し、HeLa 細胞 mRNA を鋳型として RT-PCR を行い、cDNA を単離した。この cDNA を分裂酵母用発現ベクター pAUR224 にクローニングし、pAUR-14-3-3β を構築した。すでに pREP1-vpr（チアミンの除去により Vpr の発現誘導可能なプラスミドベクター）を導入した *S. pombe* の *rad24* 遺伝子欠損分裂酵母（東京大学・岡山博人博士より分与）にこのプラスミドを導入し、aureobacidin 選択により形質転換株を得た。これらの形質転換株をチアミン非存在下で培養し、*cdc* phenotype の有無により細胞周期への影響を観察した。

14-3-3β の発現については、ウェスタン法により検出した。

哺乳動物培養細胞における Vpr 発現実験のために、Adeno-X expression system（クロンテック社）を利用して、アデノウイルスベクターを構築した。ベクターは E1 および E3 遺伝子を欠損したアデノウイルス DNA の E1 遺伝子部分に Vpr-IRES-EGFP を持ち、Ad-VIG と名づけた。コントロールとして IRES-EGFP のみを持つベクターも構築し、Ad-IG と名づけた。これらのベクターは HEK293 細胞を用いて調製し、力価を測定した。これらのベクターを種々の MOI でヒト、アフリカミドリザル、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、キツネ、マウス、コウモリ、イルカ由来の培養細胞に感染させ、48 時間後に FACS を用いて GFP の発現および細胞周期プロフィールを測定した。Vpr および GFP の発現についてはそれぞれに対する抗体を用いたウェスタン法により解析した。

C. 研究成果

一般に分裂酵母で Vpr を発現させると G₂/M arrest の誘導に伴い細胞の伸長（*cdc* 表現型）が認められる。一方、以前の報告にあるように、*rad24* 遺伝子を欠損した分裂酵母変異株では Bleomycin による DNA 損傷による G2 チェックポイントの誘導が見られないだけでなく、Vpr の発現による *cdc* 表現型も見られなかった（図 1）。この変異株にヒト 14-3-3β の cDNA を導入し発現させると、Bleomycin および Vpr に対する反応性が回復し、*cdc* 表現型を示すようになった（図 1）。

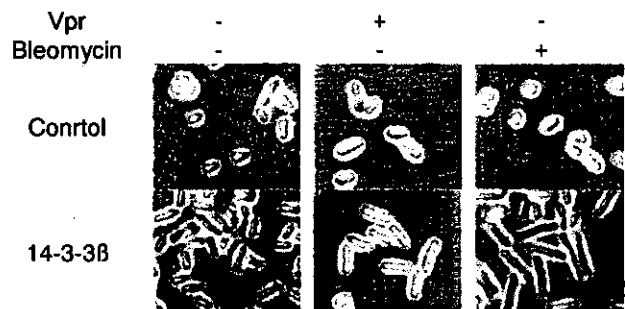


図 1. ヒト 14-3-3β による *rad24* の相補と Vpr 感受性の賦与。

Ad-VIG ベクターを HeLa や Vero 細胞に MOI=100 で感染させると、高効率で導入されることが GFP の発現を指標として確認された (表 1)。細胞周期プロフィールの解析から、Ad-VIG の導入により G₂/M 期の細胞の比率が明らかに増加し、G₂/M arrest の誘導が示された (図 2、表 1)。コントロールの Ad-IG ベクターでは G₂/M arrest の誘導は見られなかった。他の種々の哺乳動物培養細胞における Ad-VIG の導入効率にはそれぞれ違いがあったが、MOI を変えることより比較的高い導入効率 (48~98%) を得ることが可能であった (表 1)。これらの細胞で Ad-VIG が細胞周期に与える影響を解析したところ、明らかに G₂/M arrest が誘導される群と、G₂/M arrest が明らかでない群に分かれた。すなわち、HeLa (ヒト) や Vero (アフリカモリザル) に加えて、ウシ由来の MBCK やネコ由来の CRFK 細胞では Vpr による G₂/M arrest の誘導が認められたが、それ以外に用いた細胞では G₂/M arrest の誘導は明らかでなかった (表 1、図 2)。

表 1. 種々の哺乳動物細胞における Ad-VIG の導入効率と細胞周期への影響

Cell	Species	Transduction efficiency (%)		G ₂ /M arrest
			[MOI]	
HeLa	Human	64.0	[100]	+
Vero	Monkey	90.0	[100]	+
MDBK	Bovine	97.5	[1000]	+
ST IOWA	Pig	91.3	[100]	-
PK(15)	Pig	74.9	[1000]	-
MDCK	Dog	48.1	[6000]	-
CRFK	Cat	81.8	[100]	+
FoLu	Grey fox	87.6	[1000]	-
NIH 3T3	Mouse	77.8	[6000]	-
Tb1 Lu	Bat	66.8	[1000]	-
Sp1K	Dolphin	86.5	[1000]	-

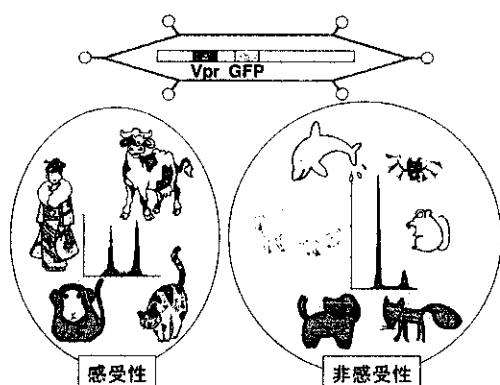


図 2. Ad-VIG ベクターによる G₂/M arrest の誘導に対して感受性を示した哺乳動物種と非感受性であった種。感受性例としてネコ由来 CRFK 細胞、非感受性の例としてキツネ由来 FoLu 細胞の細胞周期プロフィールがそれぞれ示してある。

D. 考察

分裂酵母の Wee1 は、細胞周期の G₂ 期から M 期への進行に際してブレーキ分子として働く。分裂酵母の *wee1*⁺ 遺伝子が Vpr による G₂/M arrest に必要であること、ヒト *WEE1* 遺伝子が分裂酵母の *wee1* 変異を補い Vpr 感

受性を賦与しうることを考えると、Vpr によるヒト細胞での G₂/M arrest は *WEE1* のブレーキ機能の増強に起因する可能性がある。DNA 損傷時の G₂ チェックポイントコントロールに必要な遺伝子として同定された *rad24*⁺ 遺伝子は、分裂酵母における Vpr による G₂/M arrest に必須であり、その産物のアミノ酸配列の類似から、ヒトの 14-3-3 ファミリーのホモログであると考えられている。ヒトの 14-3-3 ファミリー蛋白は今まで 7 種類が報告されているが、そのうち 14-3-3B は、*WEE1* の C 末リン酸化部位に結合し、*WEE1* の分解を抑制することが報告されている (Wang et al., 2000)。今回の実験結果から、14-3-3B は分裂酵母において *rad24* 変異を補完し、Vpr による G₂/M arrest の誘導に対する感受性を賦与することが明らかとなった。すなわち、Vpr は 14-3-3B 介する *WEE1* の安定化に依存する形で G₂/M arrest を誘導する可能性が想定される。

Vpr による G₂/M arrest の誘導に対する感受性は種特異的に規定されることが以前より指摘されている。たとえば、ヒト、サル由来の細胞では Vpr による G₂/M arrest が認められるのに対し、マウス NIH 3T3 細胞では認められない。一方、下等真核生物である分裂酵母では Vpr による G₂/M arrest が認められる。従って、Vpr 感受性を規定する宿主因子は進化的に一律に保持されているわけではない。本研究において、種々の哺乳動物細胞についてアデノウイルスベクターを用いた Vpr 発現実験を行った結果、ウシおよびネコの細胞でも Vpr による G₂/M arrest が示された。従って、ヒトやサル、分裂酵母は Vpr 感受性に関して例外的な種ではないことがわかる。今回 Vpr による G₂/M arrest に対する感受性が見出された哺乳動物種 (ヒト、サル、ウシ、ネコ) は、それぞれを宿主とし免疫不全の原因となるレンチウイルス (HIV、SIV、BIV、FIV) が同定されている。これが偶然の一致であるのか、何らかの生物学的意義があるのか、現時点では不明である。以前の報告により、Vpr の G₂/M arrest 誘導能は HIV-1 だけでなく HIV-2 や SIV など他の霊長類レンチウイルスにも見出されているが、BIV や FIV のゲノムにも、Vpr と同様の G₂/M arrest 誘導能を有するアクセサリ蛋白がコードされている可能性も考えられる。

E. 結論

Vpr による G₂/M arrest の誘導メカニズムに関する本研究および今後のより詳細な研究は、新たな抗 HIV 療法の開発に向けた基礎技術の開発につながるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Jin, Y. E., T., Ishibashi, A., Nomoto, and M. Masuda. Isolation and analysis of retroviral integration targets by solo long terminal repeat inverse PCR. *J. Virol.* 76:5540-5547, 2002.

2. 学会発表

(1) 松田 真理, 山本 勝彦, 増田 道明. アデノウイルスベクターを用いた HIV-1 Vpr の細胞周期への影響の解析. 日本ウイルス学会第 50 回学術集会, 札幌, 平成 14 年 10 月.

12. SIV Gp120 立体構造形成における糖鎖の役割

主任研究者： 佐藤 裕徳 国立感染症研究所 遺伝子解析室
研究協力者： 富田 康浩 同上

研究要旨： SIVmac239 株 Gp120 の 2 3 箇所 の N 結合型糖鎖付加部位のうち、C2 V3 領域に付加する糖鎖のいずれかが欠失するとウイルスの感染性が著しく低下する。これらの糖鎖が Gp120 の適切な立体構造形成に必要なか否かを解析した。いずれの糖鎖欠失体も小胞体分子シャペロンとの結合活性を保持し、プロセッシング感受性で細胞膜へ輸送され、膜融合能を保持し、ウイルス粒子に取り込まれた。すなわち、分子シャペロンと相互作用し、適切な高次構造を形成する際、ペプチド上の特定の位置にある糖鎖が結合する必要は無い。これらの結果は、シャペロン相互作用の動的モデル (dynamic model) を支持し、高変異性 Gp120 が蛋白質レベルで構造を維持するしくみを明らかにする手がかりとなる。

A. 研究目的

糖鎖は、小胞体において新規合成ペプチドの未成熟な高次構造状態を提示し、立体構造形成制御蛋白質と相互作用するためのタグとして機能する。適切な立体構造形成には、糖鎖を介した分子シャペロンとの相互作用が必須である。

本研究は、レンチウイルス Gp120 が極めて多数の糖鎖を付加する点に着目し、シャペロンとの相互作用様式、および高変異性 Gp120 が蛋白質レベルで多様性を維持するしくみについて理解を深めることを目的とした。

B. 研究方法

SIVmac239 株 Gp120 の細胞内立体構造形成過程をモデル系とした。Gp120 の個々の糖鎖を欠失させた糖鎖欠損変異体を用い、Env 新規合成の初期から膜輸送に至る分子過程について、以下の解析を行った。

1. 小胞体分子シャペロン結合能と動態：SIVmac239 ゲノム全長の情報を有するプラスミド DNA を HeLa 細胞に導入し、³⁵S-Met/Cys でパルスラベル・チェイス後、細胞抽出液を抗カルネキシン抗体または、抗カルレテイキュリン抗体を用いて免疫沈降解析を行った。
2. プロセッシング感受性：³⁵S-パルスラベル・チェイス後の HeLa 細胞抽出液を SIVmac239 感染ザル血漿を用いて免疫沈降解析を行った。
3. Gp120 の細胞表面発現：HeLa 細胞をメタノール不含のパラホルムアルデヒドで固定した後、抗 SIV Gp120 抗体を用いて間接蛍光抗体法を行い、染色像を共焦点顕微鏡で観察した。
4. 膜表面 Env の融合活性：MAGIC-5A 細胞に SIV プラスミド DNA を導入し、2 日

後に X-gal による染色を行い、巨核細胞を観察した。

5. ウイルス粒子への取込み：SIV DNA を導入した HeLa 細胞の培養上清をろ過 (0.45- μ m) 後に遠心してウイルス粒子部分精製画分を得、SIV 感染ザル血漿を用いたウエスタンブロット解析を行った。

C. 研究結果

1. 小胞体分子シャペロン結合能と結合動態：全ての糖鎖欠失変異体はカルネキシン、カルレテイキュリンとの結合能を保持し、結合動態に有為差は無いことを示した (Fig. 1)。
2. プロセッシング感受性：N284Q を除き、ゴルジ体への輸送とプロテアーゼ感受性に变化は無いことを示した (Fig. 2)。
3. Gp120 の細胞表面発現：Gp120 一次配列を認識する抗体 (L) を用いた解析により、全ての糖鎖欠失変異体は細胞表面に輸送されて発現することを示した。一方、Gp120 立体構造を認識する抗体 (C) を用いた解析により、N284Q、N295Q、N479Q は、野生型と異なる高次構造を形成していることを示した (Fig. 3A)。
4. 膜表面 Env の融合活性：全ての糖鎖欠失変異体 Env は、巨核細胞形成を誘導した。糖鎖欠失変異体は、細胞膜上で膜融合能を有する構造をとることを示した (Fig. 3B)。
5. ウイルス粒子への取込み：全ての糖鎖欠失変異体は、ウイルス粒子に取り込まれた。糖鎖欠失変異体は、粒子への集合能を有する構造をとることが示された (Fig. 4)。

C. 考察

小胞体分子シャペロンの作用様式には、2つのモデルが提出されている (Fig.5)。1つは“rigid model”で、未成熟蛋白質の糖鎖とシャペロンの安定な複合体が形成されて適切な高次構造が形成される (Fig.5A)。他の一つは“dynamic model”で、蛋白質の未成熟領域の糖鎖を介したシャペロンの会合と遊離の繰り返しにより、適切な高次構造が形成される (Fig.5B)。いずれのモデルにおいても、結合に関与する糖鎖はマンノースコアの末端にグルコースが一つ付加した糖鎖である。また、カルネキシンは、糖鎖を介した結合部位を一箇所だけ有する monovalent lectin であることが判明している。

Rigid model は、我々が得た結果と矛盾する。Rigid model は、一箇所の糖鎖との安定的な相互作用を前提とする。しかし、C2V3 領域の全ての糖鎖は、相互作用に必須ではなかった。一方、Dynamic model では、ペプチド上の特定の糖鎖との結合は必要無い。未成熟部分にグルコースが付加した糖鎖に結合する。一価レクチンである分子シャペロンとの結合に関与する糖鎖を特定できないことは、dynamic model でのみ説明できる。

Gp120 には多数の糖鎖が付加される。立体構造形成が dynamic model に基づくとすれば、Gp120 は、少数の糖鎖しか付加されない一般的な膜糖蛋白質に比べ、未成熟状態の提示と適切な折り畳みがおきやすいと考えられる。この特質は、Gp120 の適切な高次構造形成能を高めている可能性がある。すなわち、多数の糖鎖付加は、高変異性 Gp120 が蛋白質レベルで構造を維持するしくみの一つかもしれない。これらの点は、今後の重要な検討課題と考えている。

E. 結論

レンチウイルス Gp120 に付加する多数の糖鎖の役割について、予備的ではあるが新しいコンセプト (分子シャペロンとの動的相互作用に基づく立体構造形成制御の効率化) を提示した。今後、このコンセプトの是非について検証を重ねたい。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Kaizu M, Sato H, Ami Y, Izumi Y, Nakasone Y, Tomita Y, Someya K, Takebe Y, Kitamura K, Tochikubo O, Honda M. Infection of Macaques with an

R5-tropic SHIV Bearing a Chimeric Envelope Carrying Subtype E V3 Loop among Subtype B Framework. *Arc. Virol.* In press.

- (2) Matsuoka-Aizawa S, Sato H, Hachiya A, Tsuchiya K, Takebe Y, Kimura S, Oka S. Isolation and Molecular Characterization of a Nelfinavir (NFV)-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1 That Exhibits NFV-Dependent Enhancement of Replication. *J. Virol.* 77: 318-27, 2003.
- (3) Fukuda K, Tomiyama H, Wasi C, Matsuda T, Kusagawa S, Sato H, Oka S, Takebe Y, and Takiguchi M. Cytotoxic T cell recognition of HIV-1 cross-clade and clade-specific epitopes in HIV-1-infected Thais and Japanese. *AIDS* 16:701-11, 2002.
- (4) Kusagawa S, Sato H, Tomita Y, Masashi T, Kato K, Motomura K, Yang R, Takebe Y: Isolation and characterization of replication-competent molecular DNA clones of HIV type 1 CRF01_AE with different coreceptor usages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 18:115-122, 2002. (The first three authors contributed equally).

2. 口頭発表

- (1) Sato H, Tomita Y, Ebisawa K, Hachiya A, Oka A, Umeyama H, Takebe Y, and Nagai Y. Evolution of HIV-1 reverse transcriptase by insertion of an 11-amino-acid fragment in the enzyme active center. Keystone Symposia, Colorado, USA. 5-11 January, 2002.
- (2) Sato H. Human immunodeficiency virus and mutation. Forum for Diseases of the 21st Century. 23 Jan. 2002, Osaka.
- (3) 富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳: SIV Gp120 糖鎖変異が蛋白質の立体構造、細胞内成熟、およびウイルスの増殖活性に及ぼす影響。第50回ウイルス学会総会、2002年、札幌。
- (4) 富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳: SIV Gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割。第15回日本エイズ学会総会、2002年、名古屋。

H. 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

Fig.1 C2V3 N-glycan Mutants Interact Normally with CNX and CRT in ER

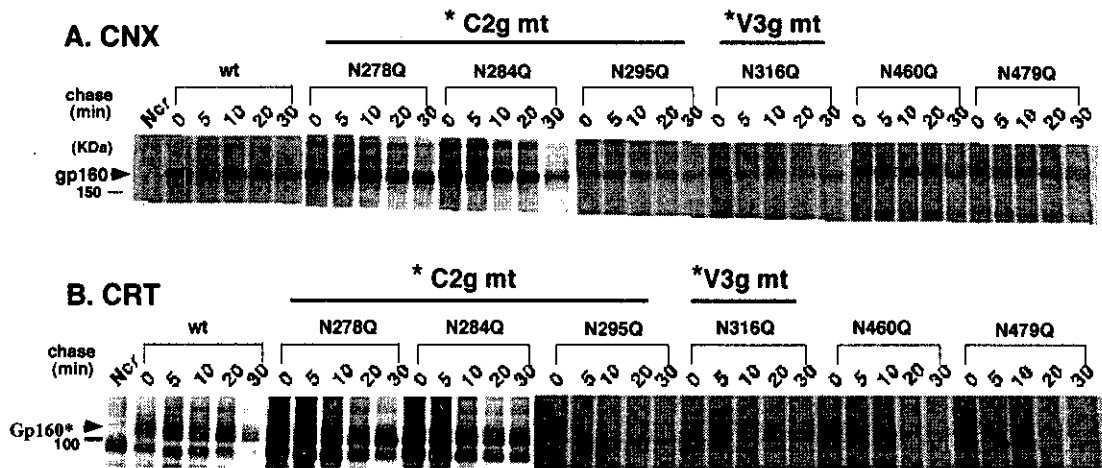


Fig.2 C2V3 N-glycan Mutants Are Transported and Processed in Golgi

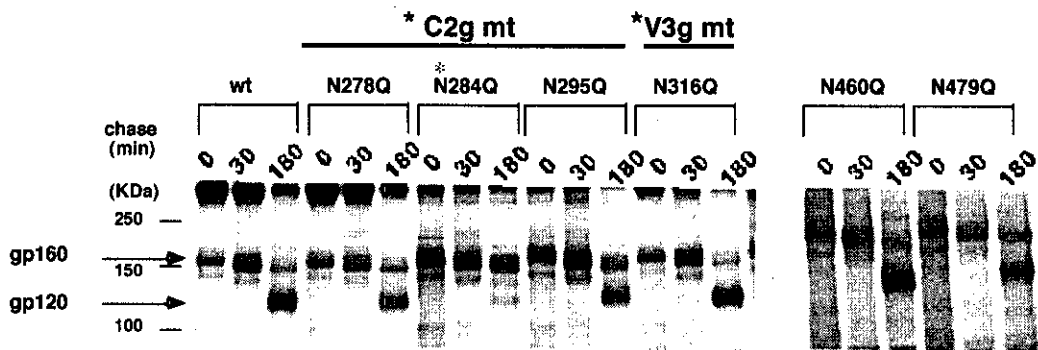


Fig.3 C2V3 N-glycan Mutants are Transported and Expressed on Plasma Membrane as Fusion Competent Conformations

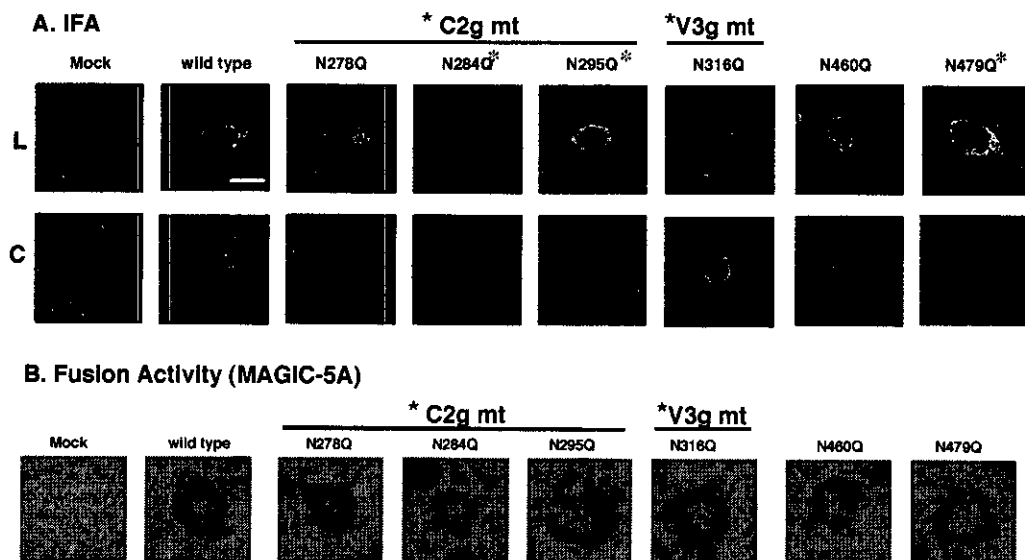


Fig.4 C2 N-glycan Mutants Are Incorporated into Virus Particle

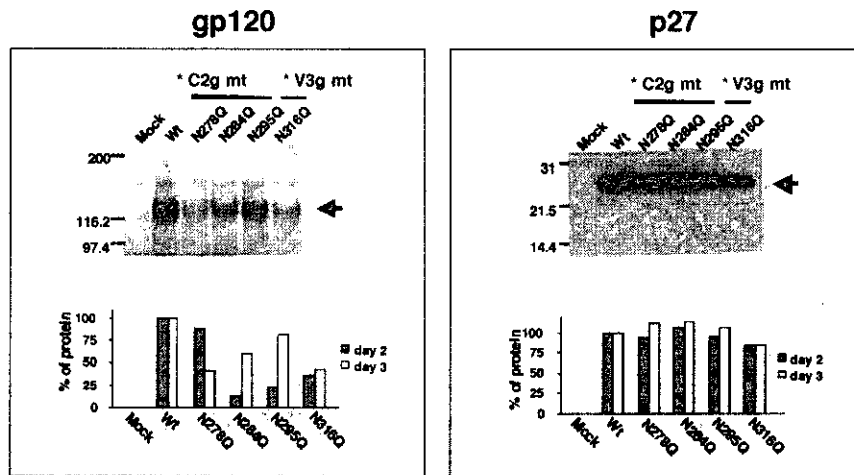
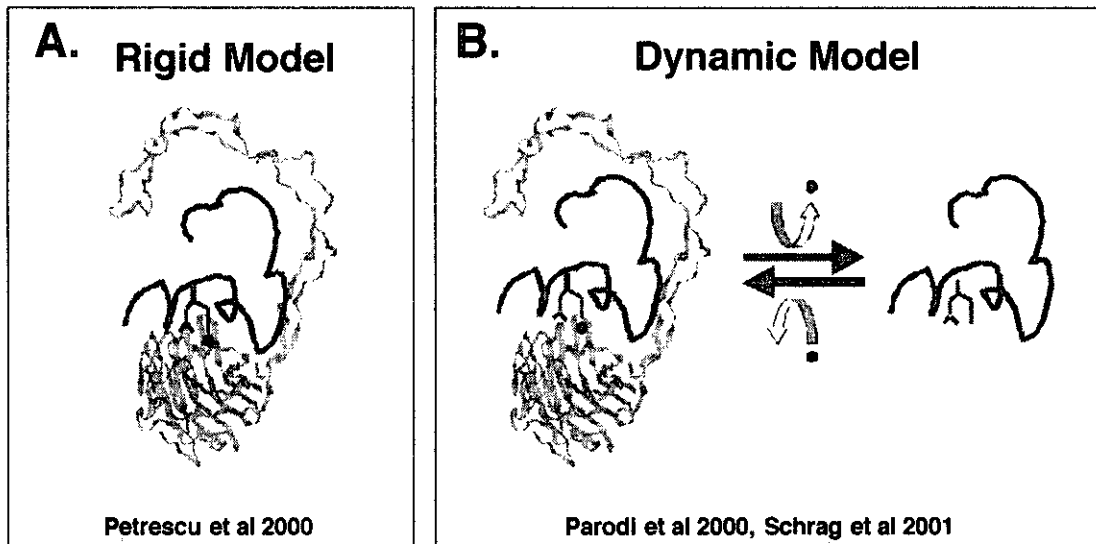


Fig.5 Models for Calnexin-Glycopeptide Interactions



13. HIV-1 gp41 膜貫通領域の GXXXG モチーフに関する研究

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

HIV-1 トランスメンブレンタンパク質 (TM) の膜貫通領域は約 20 アミノ酸からなるヘリックスと考えられている。その構造機能関連の研究は完全ではなく特異的配列が必要であるのかどうかは議論の分かれるところである。今回われわれは膜貫通領域に保存して見いだされる GXXXG モチーフに注目し変異体を作成し検討を加えた。その結果単なるモチーフの保存だけではなく、ヘリックスの部位に特有のアミノ酸配列が必要であることを示唆する結果を得た。

A 研究目的

HIV-1 のトランスメンブレンタンパク質 (TM、gp41) は感染の際のウイルス-細胞間膜融合に重要な役割を果たしている。その細胞外部分は gp120-CD4/CXCR4(CCR5) 相互作用の後 pre-hairpin form から 6 本のヘリックス束からなる hairpin form へ構造変化を遂げると考えられている。Hairpin form の構造解析から gp41 は 3 量体を形成すると考えられている。一方 gp41 細胞質内部分はウイルス粒子上への gp120/gp41 複合体の取り込みに関与していると考えられている。gp41 は膜貫通タンパク質であり約 20 アミノ酸からなる膜貫通部分 (以下 tm) をもつと考えられている。tm についてはウイルスの増殖複製に対して特異的配列が必要であることを示唆する実験データが存在する一方、一次配列上相同性の低い配列に置き換えても機能上問題が見られないとする報告もありその構造機能関連については議論の余地があ

る。HXB2 株の tm 部分の一次配列中には glycoproteinA(GpA)の膜貫通部分に見いだされた膜貫通ヘリックス間相互作用に重要な寄与をするとされる GXXXG に類似した配列 GGXXG がみられ、それらはよく保存されている。グリシン残基は多くの膜貫通ヘリックスの相互作用面によく見いだされることから HIV-1gp41 においてもグリシンを介したヘリックス相互作用が起きている可能性がある。以上の観点からわれわれは tm を GpA の膜貫通部分に置き換えた変異体およびグリシン残基の Ala, Leu への変異体の解析を通じて (1) tm における特異的配列存在の意義、(2) 膜貫通部分ヘリックス内のグリシン残基の存在の意義についての解析を行った。

B 研究方法

本研究には 実験室株 HXB2 を感染性クローンとして使用した。Env タンパク質の tm 部分を GpA の tm で置換した変異体および Env の 690, 691, 694 番目に相

当する3つのグリシン残基を部位特異的変異導入法によって、側鎖がメチル基だけのAla、比較的大きな側鎖を有するLeuにそれぞれ変異させたコンストラクトを作成した(図1)。Ala、Leu両残基ともヘリックス形成能は高いとされ、また膜貫通ヘリックス中に見いだされる頻度も高いことが知られている。変異のウイルス増殖に与える影響は変異を導入したプロウイルスDNAをT細胞株H9にトランスフェクションによって導入し、ウイルス増殖を細胞培養液中の逆転写酵素活性を測定することにより評価した。それぞれの変異についてプロウイルスDNAをCOS細胞にトランスフェクションし発現するタンパク質を細胞、ウイルス分画についてウエスタンブロッティング法により解析した。細胞内におけるEnvタンパク質の分布は抗gp120Mabによる免疫蛍光抗体法で検討した。変異Envによる細胞膜融合能はMAGI cellアッセイにより検討した。

C 研究結果

各変異体のH9細胞における増殖態度を図2に示した。GpA置換変異体ではウイルス増殖がみられなかった。グリシン変異体については690、694位のグリシンはAla、Leuへの変異によっても増殖能は保たれていた。ところが691位のグリシンについてはAla変異によっては増殖能は保存されていたがLeu変異体においては顕著な増殖低下がみられた。GpA置換体および691GL変異体における増殖

低下の原因を解明するためにまずCOS細胞におけるタンパク質発現プロフィールを検討した(図3)。ウエスタンブロッティングによる解析では増殖能の低下とタンパク質発現プロフィールの間に相関は認められなかった。すなわちGpA置換体、691GL変異体においてもEnv発現の低下や、ウイルス粒子上への取り込みに大きな変化はみられなかった。このウエスタンブロッティングの結果と一致してIFAによる解析でもGpA、691GL変異体両者に特徴的な変化は見いだせなかった(data not shown)。MAGI cellアッセイではGpA変異体では膜融合がほぼ完全に消失しており691GL変異体の融合能は野生型に比べて低下していた(図4)。

D 考察

TMの膜貫通部分(tm)変異体に予想される表現型としては、Envタンパク質発現そのものへの影響、細胞内分布への影響、ウイルス粒子上への取り込みへの影響、膜融合を含めた機能上の影響等が予想される。GpA置換体においてはEnvタンパク質の発現、細胞内分布、ウイルス粒子上への取り込みなどに顕著な変化は認められなかったが、その膜融合能は野生型に比べて著しく低下していた。GpAの一次配列にはGXXXGモチーフがみられるがこの一次配列だけの保存ではEnvタンパク質の発現や細胞表面への輸送は可能であるがEnvの融合能までの付与はできないことがわかった。これは細胞内輸送

およびウイルス粒子上への取り込みには tm よりも細胞質内部分の寄与が大であるとの報告と一致する結果である。GpA そのものは GXXXG モチーフを介して 2 量体を形成することが知られている。GpA 置換体において Env が何量体を形成しているのかは不明であるが、細胞外部分の gp41 が膜融合に際して 3 量体の hairpin form を形成しようとする際に 2 量体形成能をもつ tm の存在が阻害効果をもたらしている可能性がある。一方、グリシンの変異体ではすべての変異体において GpA 同様、発現、細胞内分布等に大きな影響は見られなかった。しかし野生型に比べると膜融合能は低下しており、特に 691 位のグリシンを Leu に変化させた変異体では膜融合能がさらに低下しており、この変異体では感染性の著名な低下が認められた。グリシン残基は膜貫通部分ヘリックスにおいて、ヘリックス相互作用面に見いだされることが多いとされている。その相互作用にはその側鎖の小ささが寄与していると考えられる。今回の変異体でもメチル基を側鎖にもつ Ala への変異では感染性が保存されたが、側鎖の大きい Leu への変異では特に 691 位で感染性への顕著な影響が認められた。690, 694 位での Leu 変異では感染性が保たれることから 691 位と 690, 694 位では側鎖のサイズに対する許容性に差があることが明らかとなった。これはそれぞれのグリシン残基のヘリックス内での空間的配置の違いによるヘリックス間相互作用

面間での距離の差によるものとも考えられるが、今回の結果のみでは結論をだすことはできない。

E 結論

TM 膜貫通部分のアミノ酸配列は GXXXG モチーフのみが保存されるだけの置換では TM としての機能を果たすことができない。さらに Leu のように膜貫通部分ヘリックスによくみられるアミノ酸でその導入される部位によってはウイルス複製に重篤な影響を与えることから、tm 部分は疎水性のヘリックスであれば機能を保存したままで置換できるという概念は一般性を持たないことが示された。

F 健康危険情報

該当なし

G 研究発表

学会発表

宮内浩典、横幕能行、駒野淳、杉浦亙、松田善衛、HIV-1 gp41 膜貫通領域の GXXXG モチーフに関する研究、第 50 回日本ウイルス学会、札幌、2002 年 10 月

H 知的所有権の取得状況

該当なし

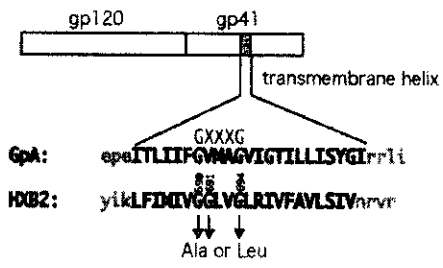


Figure 1. Transmembrane (tm) mutants used in this study

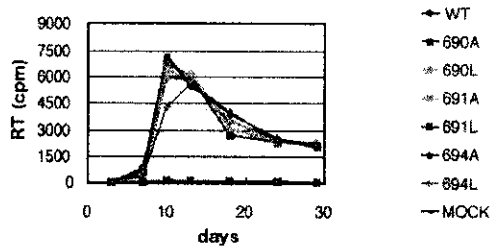


Figure 2. Replication profile of tm mutants

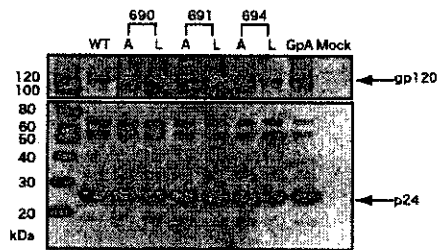
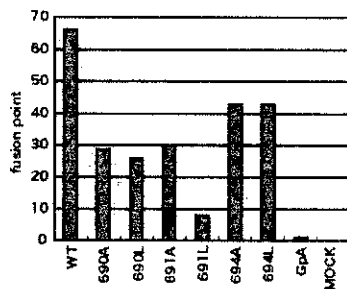


Figure 3. Viral protein profile of tm mutants



fusion points $2x+y$
 x = number of multi nucleuse cell (nucleuse number ≥ 5) / 5 visual field
 y = number of multi nucleuse cell (nucleuse number < 5) / 5 visual field

Figure 4. Fusion activity of tm mutants

分担研究報告書

14. HIV アクセサリー蛋白質の機能解析

分担研究者 足立昭夫（徳島大学大学院医学研究科ウイルス病原学分野）

研究要旨 HIV の複製機構および病原性発現機序の解明のため、アクセサリー蛋白質の系統的、網羅的解析を行なった。本年度の特に重要な成果は以下のごとくである。(1) HIV-Vif の多くは細胞中でプロテアソーム分解を受けるが、Vif 内の E88 と W89 (など) によりその機能に必要な発現量が保たれている。細胞内のプロテアソーム分解システムは Nef、Vpu、Gag より Vif に対してはるかに強く働く。(2) HIV-2 Vpx には T リンパ球とマクロファージでのウイルス増殖にクリティカルな領域が別個に存在する。また、Vpx 内には両方の細胞でのウイルス複製に重要な領域もある。

A. 研究目的

HIV には他のレトロウイルスには存在しない 5 種類のアクセサリー蛋白質 (Vif、Vpx、Vpr、Vpu、Nef) があり、ウイルス複製や病原性発現に重要な役割を果たしている。しかし、特定の細胞でしか機能しないこと、また、様々な活性があることなどから、アクセサリー蛋白質の作用機序の全体像は不明である。本研究では、系統的かつ網羅的な変異体解析を基本手技とし、さらに新たな実験系を構築することで HIV のアクセサリー蛋白質の機能解明を目指す。

B. 研究方法

HIV の感染性分子クローン pNL432 (HIV-1) および pGL-AN (HIV-2) から遺伝子工学的手法により一連の変異体等を作製した。HIV の生物活性解析に頻用されるウイルス学的あるいは生化学的手法を用いて、それぞれのクローンにつき詳細な解析を行なった。

C. 研究結果

1. **Vif** 192 アミノ酸から成る HIV Vif (NL432) の 88 番目から 93 番目のアミノ酸配列 (EWRKKR) には荷電残基が集中的に含まれている。この領域の機能を知るため、様々な変異体を構築し、非許容細胞 H9 でのウイルス増殖と Vif の発現を検討した。その結果、この領域の親水性や電荷の程度はウイルス増殖に関係しないことが明らかになった。一方、表 1 の 1 アミノ酸欠失体の実験結果に示したように、E88 および W89 は Vif の安定的発現とウイルス増殖に必須であった。64-67 番のアミノ酸もウイルス増殖に必須であった。E88 欠失体の Vif 発現量の低下はプロテアソーム阻害剤の添加で回復した。また、プロテアソーム阻害剤添加後の Vif 発現量の増加は Nef、Vpu、Gag のそれよりはるかに多いことがわかった。
2. **Vpx** Vpx の点変異体の増殖能を T リンパ