

球株 HSC-F とマクロファージとで検討した。図 1 に示したように、どちらか一方の細胞あるいは両方の細胞でのウイルス複製に重要であるアミノ酸の存在が明らかになった。

3. **Nef** Nef による MHC-I 発現抑制が HIV-1 の CTL の細胞傷害活性からの回避および CTL の液性因子の産生能の低下をもたらしていることを示した (熊本大学の滝口雅文教授グループとの共同研究)。
4. **ハイブリッドウイルス** HIV-1 *gag* CA 領域に SIVmac の対応する領域を挿入した HSIV を 49 種類構築した。現在までの解析では、これらの中にサルリンパ球で増殖するクローンは見つかっていない。

#### D. 考察

1. **Vif** Vif 内の 64-67 および 86-89 番のアミノ酸は推定  $\beta$ -strand 上にある。この構造がウイルス複製に必須であることは表 1 より明らかだが、Vif の発現量との関係は今後の検討を要する。非常に重要なことに、他の HIV 蛋白質と比較して Vif はプロテアソーム分解を受けやすい。そのメカニズムやウイルス学的意義の解明は今後の大きな課題である。Vif の立体構造の決定を視野にこの課題に取り組んでいきたい。
2. **Vpx** 図 1 から T リンパ球やマクロファージでのウイルス複製に重要な Vpx 内領域の存在は明らかである。今後、図 1 の実験で使用した点変異体をさらに解析し、この現象の機構を解明したい。その結果をホモロジーモデリングで求めた立体構造との関係で議論する必要がある。

#### E. 結論

今年度は、HIV-1 Vif と HIV-2 Vpx に関して

のプロジェクトが大きく進展し、新しいコンセプトを提示できるまでになった。今後は、これら蛋白質の立体構造に基づく解析が極めて重要である。Vpx と異なり、Vif は立体構造が全く未知であるので、この解明を目指したい。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Matsumoto, S., Miyaura, M., and Adachi, A. 2002. Subtle mutations in the cysteine region of HIV-1 Vif drastically alter the viral replication phenotype. *Microbes and Infection* 4: 621-624.
- (2) Tomiyama, H., Akari, H., Adachi, A., and Takiguchi, M. 2002. Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on human immunodeficiency virus type 1-specific CD8<sup>+</sup>-T cell cytolytic activity and cytokine production. *Journal of Virology* 76: 7535-7543.
- (3) Fujita, M., Matsumoto, S., Sakurai, A., Doi, N., Miyaura, M., Yoshida, A., and Adachi, A. 2002. Apparent lack of trans-dominant negative effects of various *vif* mutants on the replication of HIV-1. *Microbes and Infection* 4: 1203-1207.
- (4) Fujita, M., Sakurai, A., Yoshida, A., Miyaura, M., Koyama, A.H., Sakai, K., and Adachi, A. 2003. Amino acid residues 88 and 89 in the central hydrophilic region of human immunodeficiency virus type 1 Vif are critical for viral infectivity by enhancing the steady-state expression of Vif. *Journal of Virology* 77: 1626-1632.
- (5) Ueno, F., Shiota, H., Miyaura, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki, J., Koyama, A.H., Akari, H., Adachi, A., and Fujita, M. 2003. Vpx and Vpr proteins of HIV-2 up-regulate the viral infectivity by a distinct mechanism in lymphocytic cells. *Microbes and Infection*, in press.
- (6) Fujita, M., Yoshida, A., Sakurai, A., Tatsuki,

J., Ueno, F., Akari, H., and Adachi, A. 2003. Susceptibility of HVS-immortalized lymphocytic HSC-F cells to various strains and mutants of HIV/SIV. *International Journal of Molecular Medicine*, in press.

- (7) 足立昭夫 2002. ケモカイン. 感染症の宿主防御機構—理論と実際, pp112-121, 医薬ジャーナル社.
- (8) 足立昭夫、上野史子、藤田美歌子 2003. HIV-1, 2. 新世紀の感染症学, 日本臨床社, 印刷中.

## 2. 学会発表

- (1) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、上野史子、小山 一、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif の 88, 89 番目のグルタミン酸残基とトリプトファン残基は蛋白質の安定性とウイルス複製に必須である. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌.
- (2) 藤田美歌子、吉田亜希子、櫻井明子、上野史子、小山 一、足立昭夫 (2002) HIV-2 Vpx 蛋白質にはマクロファージとリンパ球系 HSC-F 細胞でのウイルス増殖に重要な領域が別個に存在する. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌.
- (3) 明里宏文、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif 蛋白質はウイルス粒子内においてプロテアーゼによる Gag 前駆体の p2-NC プロセッシングを特異的に阻害する. 第 50 回日本ウイルス学会学術集会、札幌.
- (4) 藤田美歌子、櫻井明子、上野史子、足立昭夫 (2002) マクロファージとリンパ球系細胞での HIV-2 増殖にそれぞれ特異的に関与する Vpx 内領域. 第 16 回日本エイズ学会学術集会、名古屋.
- (5) 藤田美歌子、櫻井明子、上野史子、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif 蛋白質の安定化に必須なアミノ酸配列. 第 16 回日本エイズ学会

学術集会、名古屋.

- (6) 明里宏文、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif 蛋白質に関する機能解析. 第 16 回日本エイズ学会学術集会、名古屋.
- (7) 藤田美歌子、櫻井明子、吉田亜希子、上野史子、小山 一、足立昭夫 (2002) HIV-1 Vif には蛋白質の安定性を支配する領域がある. 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜.
- (8) 藤田美歌子、吉田亜希子、櫻井明子、上野史子、小山 一、白井宏樹、松尾 洋、足立昭夫 (2002) HIV-2 Vpx にはリンパ球系細胞とマクロファージでのウイルス増殖に必要な領域が別個に存在する. 第 25 回日本分子生物学会年会、横浜.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし.

### 2. 実用新案登録

なし.

### 3. その他

なし.



15. 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

- HIV 粒子のプロテオーム解析 -

協力研究者 三隅将吾 熊本大学・薬学部・生化学 助教授

研究要旨：HIV 粒子のプロテオーム解析は、ウイルス複製に必須である新規の蛋白質や翻訳時・後修飾をウイルス粒子より直接同定することにより蛋白質分子レベルでウイルスの複製過程を理解する上で有効な手段になり得ると考え、現在までに以下のような知見を得ることができた。

**1) ホルミル化 HIV-1 p24 の発見**

ウイルス粒子内にホルミル化 HIV-1 p24 が検出された。ホルミル化 HIV-1 p24 のウイルス粒子内での役割は、現在解析中であるが、HIV-1 p24 のアミノ末端 Pro<sub>1</sub> は、Asp<sub>51</sub> と salt bridge を形成することにより HIV-1 p24 間の相互作用に必要なβ-hairpin 構造形成に重要な役割を担っていることが知られており、HIV-1 p24 がホルミル化されることによりβ-hairpin 構造形成が阻害され、その結果、HIV-1 p24 間の相互作用が弱められ、ウイルスが宿主細胞へ感染後、HIV-1 p24 core が disassembly される際にホルミル化が寄与している可能性が示唆された。

**2) HIV-1 のライフサイクルに関与する3つの cyclophilin A isoform の発見**

ウイルス粒子内に宿主由来の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin A (CyPA)の2個の isoform を同定した (pIs 6.40 ,6.53)。これらの内 CyPA<sub>6.53</sub> は、アミノ末端がアセチル化を受けていることが同定された。さらに、CyPA は、ウイルス粒子外にも同定され (pI 6.88)、この CyPA<sub>6.88</sub> は、ウイルス粒子が出芽後、成熟化する際にウイルス粒子内からウイルス粒子外へ再分布することがわかった。

A. 研究目的

蛋白質は、ゲノムから転写・翻訳された後、その機能に直接影響する様々な翻訳時・後修飾を受けるものが多く存在することが知られており、ヒトの場合、それら機能性蛋白質は、さらに断片化されたりすることにより、100 万種類以上存在すると考えられている。つまり、ヒトゲノムに存在する約 3 万の遺伝子を解析するのみでは、疾患のメカニズムを解明するというようなことは、極めて困難である。また、細胞内での mRNA の発現量と蛋白質の産生量が必ずしも一致せず、蛋白質の安定性や、蛋白質-蛋白質相互作用は遺伝子を見ているだけでは十分解明できないという理由か

らも、遺伝子を解析するだけでなく、蛋白質も十分解析する必要があることからプロテオーム解析が注目されている。さらにプロテオーム解析が注目されているもう一つの背景には、技術的な進歩によるものも大きく、一般的なプロテオーム解析には、第 1 段階として蛋白質の 2 次元ゲル電気泳動による分離が必須であるが、固定化 pH 勾配ゲルを 1 次元目に用いた 2 次元ゲル電気泳動法が再現性のあるパターンが得られる手法としてほぼ確立しつつある点や、mass spectrometry の普及により、プロテオームをゲノム解析の情報と対応させることが容易になった点があげられる。このような状況のもと我々は、これまでに i) N-ミ

リストイル化タンパク質のアミノ酸配列決定法の確立や、ii) HIV-1 protease の自殺阻害機構の解明及び、iii) AIDS ワクチンの創製に mass spectrometry を駆使し、AIDS 研究において一貫して蛋白質の側から解析してきたことを活かすウイルス粒子中のタンパク質のプロテオーム解析をおこなうために HIV 粒子の精製から手がけ、ウイルス複製に必須である新規の蛋白質や翻訳時・後修飾をウイルス粒子より直接同定することにより蛋白質分子レベルでウイルスの複製過程を理解することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 精製ウイルス粒子の調製

HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1) の培養上清をフィルター濾過後、超遠心し、ウイルスと microvesicle 混合物を得たのち、得られた沈査をズブチリシンで処理し、さらに SepharoseCL-4B カラムを用いてゲル濾過した精製ウイルスを可溶化しプロテオーム解析の試料とした。

### 2) 2次元電気泳動及び染色法

二次元電気泳動は、一次元目を固定化 pH ゲル (pH6-11L) で、二次元目をアクリルアミドゲル (12-14%) で行い、銀染色およびサイプロルビーで染色した。

### 3) Peptide mass fingerprint (PMF)の作製および蛋白質の同定

最終的にタンパク質の同定はトリプシンによる酵素処理, MALDI TOF-MS による質量分析, 及びデータベース検索により作製した。

## C. 実験結果

HIV-1 粒子の HIV 粒子のプロテオーム解析を行うにあたりウイルス粒子のみを得る必要がある。そこで HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1) の培養上清中に、ウイルス粒子とともに放出される

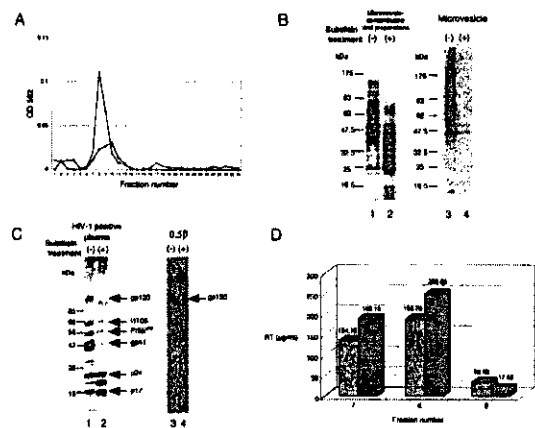


Fig. 1. Fluorescence profiles of HIV-1 particles and microvesicles. (A) Fluorescence profile of the microvesicle-enriched HIV-1<sub>12-15</sub> preparation (left) and microvesicles alone (right) determined with a fixed volume of Epifluor 22 (0.025 optical density) by SDS-PAGE of the microvesicle-enriched HIV-1<sub>12-15</sub> preparation and microvesicles alone derived from HIV-1<sub>12-15</sub> cultures containing non-solubilized and solubilized HIV-1<sub>12-15</sub> particles. (B) Western immunoblot analysis of the solubilized HIV-1<sub>12-15</sub> preparations and microvesicles. (C) Western immunoblot analysis of the solubilized HIV-1<sub>12-15</sub> preparations and microvesicles. (D) RT activity of HIV-1<sub>12-15</sub> particles and microvesicles. RT activity of each fraction containing HIV-1<sub>12-15</sub> particles and microvesicles is shown in the bar graph. The bars have been divided by means of densitometric analysis using a Shimadzu CS-9300 image analysis system. Error bars represent standard deviation.

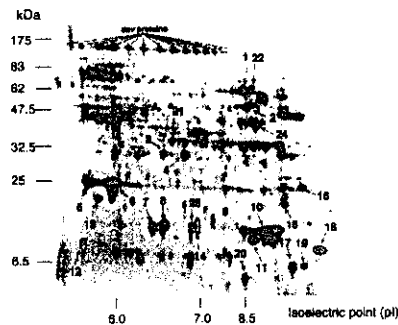


Fig. 2. 2D gel image of HIV-1<sub>12-15</sub>. The horizontal axis shows protein separation by molecular weight, increasing the vertical axis shows protein separation by isoelectric point. The gel was silver stained. 2D-SPY PMF standards (Protein 100 mass fractions) were used for the identification of 2D spots. The most striking abundance of these standards is that their molecular composition is 2D. The 2D gel image shows the results obtained after reprecipitation of the proteins of the solubilized HIV-1<sub>12-15</sub> preparation and microvesicles. The spots of the non-solubilized HIV-1<sub>12-15</sub> preparation, HIV-1<sub>12-15</sub> particles, HIV-1<sub>12-15</sub> particles and microvesicles are highlighted in red. Spots derived from microvesicles are highlighted in black.

TABLE 1. Data for protein spots excised from the 2D gel

Spot	Protein name	Accession no. (1)	pI	MW (kDa)	pI	MW (kDa)
1	Myristoylated haemagglutinin (H1)	Q01731	18.2	4.42	176	44.9
2	Full length HIV-1	P03332	27.2	4.28	176	44.9
3	Integrase (HIV)	Q03344	21.9	4.53	40	5.16
4	Reverse transcriptase (HIV)	Q03343	28.1	6.90	38	7.19
5	Class 2 zinc protein (Zn finger motif)	P03348	11.1	1.68	24	6.26
6	Class 2 zinc protein (Zn finger motif)	P03349	54.1	4.59	24	6.26
7	Protein phosphatase 1 (HIV)	P03352	46.7	4.40	16	7.22
8	Protein phosphatase 1 (HIV)	P03353	41.3	4.53	16	7.22
9	Class 1 zinc protein (Zn finger motif)	P03346	25.2	4.11	17	9.29
10	Class 1 zinc protein (Zn finger motif)	P03347	31.1	7.12	16	7.22
11	Class 1 zinc protein (Zn finger motif)	P03348	59.8	3.25	12	6.26
12	Protein phosphatase 1 (HIV)	P03352	46.7	4.40	16	7.22

1. Spot 1 and 2 are not shown in Fig. 2.  
 2. Spot 1 and 2 are not shown in Fig. 2.  
 3. Spot 1 and 2 are not shown in Fig. 2.  
 4. Spot 1 and 2 are not shown in Fig. 2.  
 5. Spot 1 and 2 are not shown in Fig. 2.

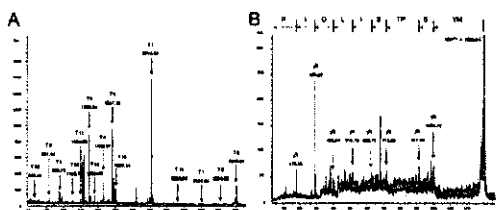


Fig. 3. Typical peptide digests and PMF spectra of HIV-1 particles (A) and microvesicles (B). The peptides were digested with trypsin and analyzed by MALDI-TOF MS. The mass spectra were obtained from the peptides digested with trypsin and analyzed by MALDI-TOF MS. The mass spectra were obtained from the peptides digested with trypsin and analyzed by MALDI-TOF MS.

microvesicle を除去するために、超遠心により得られたウイルス沈査からゲル濾過によって血清由来のアルブミンを除去後、ズブチリシンを作用させることにより、microvesicle をほぼ完全に

除去することに成功した (Fig. 1)。ただし、この時、得られたウイルス粒子は、同時にウイルス表面の gp120 もズブチリシンにより除去されているが、ウイルス粒子内のウイルス構成蛋白質には影響がなかった (Fig. 1D)。本研究では、ウイルスの複製に必須であるウイルス粒子内の構成蛋白質の同定とその翻訳時・後修飾の同定を目的としているためこのズブチリシン処理ウイルス粒子を以下のプロテオーム解析のサンプルとして用いプロテオーム解析を行った。その結果、Fig. 2 に示すような HIV-1 粒子の 2D-PAGE MAP 作製することができ、ウイルス粒子内に 24 個の蛋白質による特異的なスポットが観察された (尚、Fig. 2 は subtilisin 未処理のウイルス粒子の 2D gel パターンに、subtilisin 処理のウイルス粒子の 2D gel パターン及び miclovessicle のみの 2D gel パターンを重ね合わせたもの)。そのうち、ウイルス由来 (9 個) 及び宿主由来 (2 個) の蛋白質を現在までに同定した (TABLE 1)。

これらの内、我々はまず spot6 に注目し詳細な解析を行ったところ、spot6 の PMF の結果 (Fig. 3A) 及び得られた tryptic peptide T8 の PSD 解析の結果 (Fig. 3B) から、spot6 は HIV-1 p24 由来のスポットであることを同定した。さらに、spot6 の PMF 作製の際、HIV-1 p24 の N 末端 tryptic peptide (1-18) の理論値から分子量が約 28 異なる分子量 2044 の tryptic peptide が得られ、この peptide は、2D gel を銀染色した場合だけでなく、クーマシーブリリアントブルー R250 でも得られることから銀染色による副生成物ではないことを確認した (Fig. 4A)。この分子量 28 の違いからホルミル化されている可能性が考えられた

ため、常法に従って 0.6N HCl で脱ホルミル化を行ったところ N 末端がホルミル化されていることが判った (Fig. 4B)。さらに実際に N 末端

tryptic peptide (1-18) のどのアミノ酸がホルミル化され

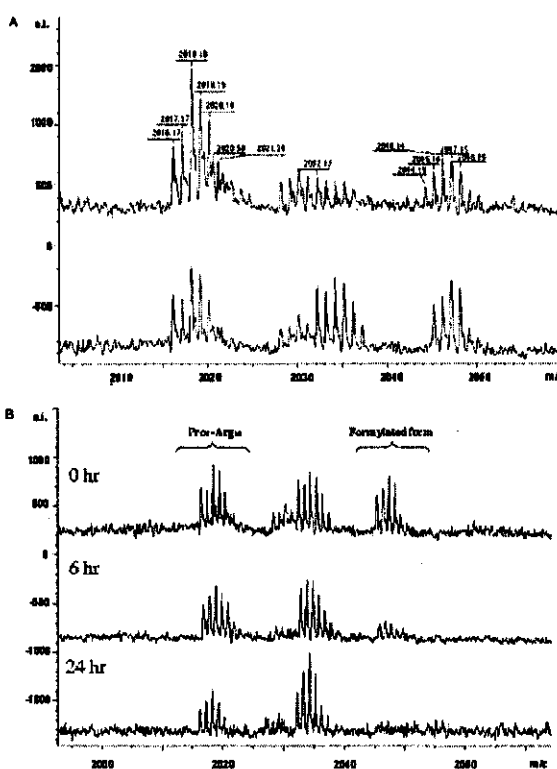


Fig. 4. Formylation of HIV-1 p24<sup>pro</sup>. (A) As shown in the upper spectrum, the major peaks of  $[M + H]^+$  at  $m/z$  2016.17 represent the N-terminal tryptic peptide (Pro<sub>1</sub>-Arg<sub>18</sub>) of HIV-1<sub>LAV-1</sub> p24<sup>pro</sup> derived from silver staining gel. The other peaks of  $[M + H]^+$  at  $m/z$  2032.13 and 2044.19 could be assigned to the methionine-oxidized form and the formylated form of the N-terminal tryptic peptide (Pro<sub>1</sub>-Arg<sub>18</sub>), respectively. As shown in the lower spectrum, these peaks were also detected in the spot corresponding to HIV-1<sub>LAV-1</sub> p24<sup>pro</sup> derived from Coomassie brilliant blue R-250 staining gel. The molecular mass of 28.02 corresponding to the formyl group was deleted. (B) The formyl group was sequentially cleaved off with 0.6N hydrochloric acid as described in Materials and methods.



Fig. 5. PSD spectrum of N-terminal tryptic peptide, PIVQNIQQQMV HQAISP. a-, b-, and y'-dominant fragment ions, defined according to the nomenclature of Biemann [21], are shown, confirming the partial sequences (amino acids 1-7, and amino acids 10-18). fP is defined as a formylated proline.

ているのかを PSD 解析を行ったところ、アミノ

末端 Pro がホルミル化されていることを発見した (Fig. 5)。

次に、我々は spot 7, 8, 25 について詳細な解析をおこなった。その結果、spot 7 及び 8 よりウイルス粒子内には等電点の異なる 2 つの cyclophilin A (CyPA) isoform (pIs 6.40, and 6.53) が取り込まれていることが判った (TABLE 2)。これら isoform の内、pI 6.53 の isoform は、N 末端がアセチル化を受けていることが、N 末端 tryptic peptide(1-18) の PSD 解析及び N-acetylamino acid releasing enzyme を用いて明らかとなった (Fig. 6)。さらに spot 25 の解析により pI 6.88 の isoform は、subtilisin 処理により 2D gel 上からそのスポットが消失するとともに、実際に電子顕微鏡を用いたウイルス粒子の解析からウイルス粒子表面に存在することが明らかとなった (Fig. 7)。

#### D. 考察

HIV-1 p24 のアミノ末端 Pro<sub>1</sub> は、Asp<sub>51</sub> と salt bridge を形成することにより HIV-1 p24 間の相互作用に必要な  $\beta$ -hairpin 構造形成に重要な役割を担っていることが知られており (Gitti et al., Science 273 (1996)231-235)、HIV-1 p24 のアミノ末端がホルミル化されることにより  $\beta$ -hairpin 構造形成が阻害され、その結果、HIV-1 p24 間の相互作用が弱められ、ウイルスが宿主細胞へ感染後、HIV-1 p24 core が disassembly される際にホルミル化が寄与している可能性が示唆された。

さらに、本研究によりウイルス粒子には 3 つの CyPA isoform が存在し、その内、明確なウイルス学的な意義は明確ではないが CyPA6.53 はアミノ末端がアセチル化を受けウイルス粒子内に存在することが明らかとなった。また、HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1) の細胞表面には、

CyPA が発現していないことが FACS 分析により明らかにす

TABLE 2. Comparison of theoretical masses and observed masses derived from tryptic digests of spots 7,

Spot	Tryptic peptide (residue number)	Mass (Da)		Corresponding sequence	No. of missed cleavages
		Theoretical	Observed		
7	I1 (1-18)	1,960.00	1,960.30	VNPTVFFDIAYDGEPLGR	0
	I2 (18-36)	1,379.76	1,380.06	VSEIIFADKVPK	1
	I3 (31-50)	737.36	737.35	TAENFR	0
	I4 (76-99)	1,831.01	1,832.20	SIYGEKEDENFLK	1
	I5 (102-99)	1,154.37	1,153.58	FEENFLK	0
	I6 (116-124)	648.41	648.35	TEWLDGK	0
	I7 (118-130)	1,513.80	1,513.57	TEWLDGKIVVFGK	1
	I8 (118-132)	1,742.96	1,742.91	TEWLDGKIVVFGMK	1
	I9 (131-131)	1,000.00	1,000.26	ASQPIVVEFDIAYDGEPLGR	1
	I10 (131-36)	537.36	537.37	TAENFR	0
8	I11 (1-18)	1,960.00	1,960.26	VNPTVFFDIAYDGEPLGR	0
	I12 (18-36)	1,379.76	1,379.76	VSEIIFADKVPK	0
	I13 (31-50)	737.36	737.37	TAENFR	0
	I14 (76-99)	1,831.01	1,831.21	SIYGEKEDENFLK	1
	I15 (102-99)	1,154.37	1,153.58	FEENFLK	0
	I16 (116-124)	648.41	648.35	TEWLDGK	0
	I17 (118-130)	1,513.80	1,513.57	TEWLDGKIVVFGK	1
	I18 (131-143)	1,505.75	1,504.80	VSEEDINVELAMER	1
	I19 (133-143)	1,278.58	1,278.80	EGMNIIVLAMER	1
	I20 (1-18)	1,960.00	1,960.30	VNPTVFFDIAYDGEPLGR	0
25	I21 (1-18)	1,960.00	1,960.26	VNPTVFFDIAYDGEPLGR	0
	I22 (18-36)	1,379.76	1,379.76	VSEIIFADKVPK	0
	I23 (31-50)	737.36	737.37	TAENFR	0
	I24 (76-99)	1,831.01	1,831.21	SIYGEKEDENFLK	1
	I25 (102-99)	1,154.37	1,153.58	FEENFLK	0
	I26 (116-124)	648.41	648.35	TEWLDGK	0
	I27 (118-130)	1,513.80	1,513.57	TEWLDGKIVVFGK	1
	I28 (131-143)	1,505.75	1,504.80	VSEEDINVELAMER	1
	I29 (133-143)	1,278.58	1,278.40	EGMNIIVLAMER	0

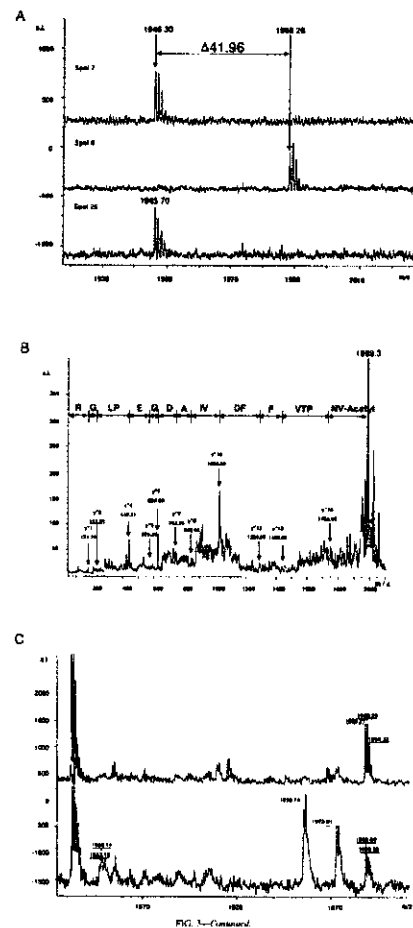


FIG. 6. Spectra of N-terminal tryptic peptides derived from CyPA and corresponding to spots 7, 8, and 25: positive decay spectrum and N-acetylamino acid-releasing enzyme treatment of an N-terminal tryptic peptide derived from the spot 8 protein, N-acetyl-VNPTVFFDIAYDGEPLGR. (A) MALDI-TOF mass spectra of N-terminal tryptic peptides derived from CyPA and corresponding to spots 7, 8, and 25. As shown in the top and bottom spectra, the peaks of (18 + 11) at m/z 1,960.30 and 1,965.70 represent N-terminal tryptic peptide Val<sub>1</sub>-Arg<sub>18</sub> of CyPA. As shown in the middle spectrum, the peak of (18 + 11) at m/z 1,960.26 could be assigned to the acetylated form of N-terminal tryptic peptide Val<sub>1</sub>-Arg<sub>18</sub>. The fragment with a molecular mass of 41.96 and corresponding to the acetyl group was detected as a doublet intensity. (B) MS determination of the partial peptide sequence of the N-terminal tryptic peptide derived from the spot 8 protein. Y series ions were defined according to the nomenclature of Shimizu (2) (C) Liberation of N-acetylated Val<sub>1</sub> from the N-terminal peptide derived from the spot 8 protein. As shown in the lower spectrum, the peak at m/z 1,967.18 and corresponding to the peptide Asx<sub>1</sub>-Arg<sub>18</sub> (theoretical mass, m/z: 1,966.03) was detected after N-acetylamino acid-releasing enzyme treatment. The peak at m/z 1,967.15 was not found before N-acetylamino acid-releasing enzyme treatment (upper spectrum). The unknown peaks of (18 + 11) at m/z 1,959.34 and 1,971.61 were also found in control experiments under identical conditions, except for the omission of tryptic peptides derived from the spot 8 protein.

ることができたことから、CyPA6.88 はウイルス

粒子が成熟することに伴って、ウイルス粒子内からウイルス粒子外へ移行することが示唆された。

なお、このメカニズムについては現在解析中である。

E. 結論

プロテオーム解析は、ウイルス複製に必須である新規の蛋白質や翻訳時・後修飾を同定することにより蛋白質分子レベルでウイルスの複製過程を理解する上で有効な手段になり得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misumi, S., T. Fuchigami, N. Takamune, I. Takahashi, M. Takama, and S. Shoji. 2002. Three isoforms of cyclophilin A associated with human immunodeficiency virus type 1 were found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J. Virol.* 76:10000-10008.
- 2) Fuchigami, T., S. Misumi, N. Takamune, I. Takahashi, M. Takama, and S. Shoji. 2002. Acid-labile formylation of amino terminal proline of human immunodeficiency virus type 1 p24gag was found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:1107-1113.
- 3) Takamune, N., H. Hamada, H. Sugawara, S. Misumi, and S. Shoji 2002. Development of enzyme-linked immunosorbent assay

for measurement of activity of myristoyl Coenzyme A: protein N-myristoyltransferase. *Anal. Biochem.* 309:137-142.

Takamune, N., H. Hamada, S. Misumi, and S. Shoji. 2002. Novel strategy for anti-HIV-1 action: selective cytotoxic effect of N-myristoyltransferase inhibitor on HIV-1-infected cells. *FEBS Lett.* 527:138-142

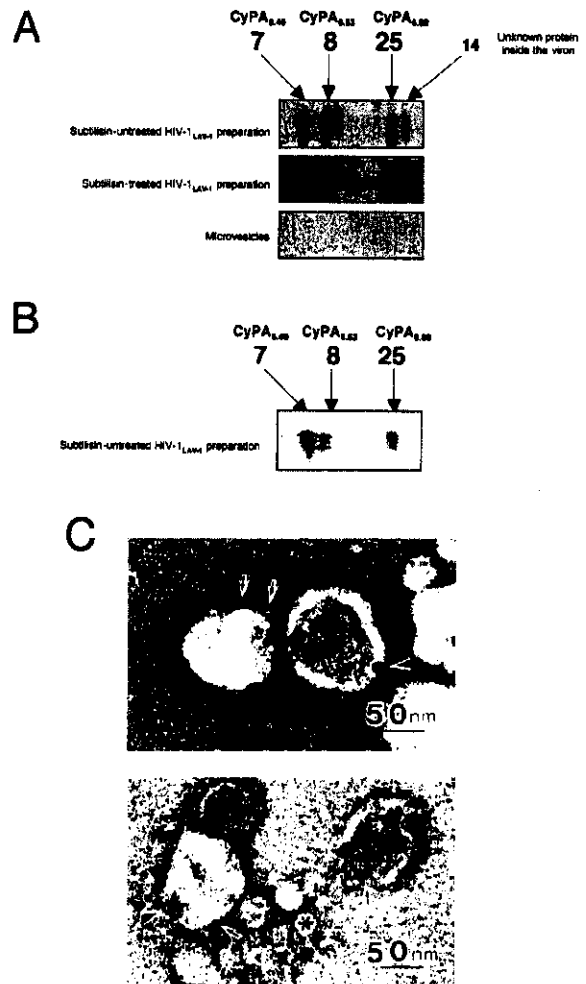


Figure 1. Identification of cyclophilin A isoforms in HIV-1 particles. (A) 2D gel electrophoresis and protein identification by MALDI-TOF MS of the sucrose-untreated HIV-1 preparation. The spots 7, 8, and 25 were identified as cyclophilin A isoforms. (B) 2D gel electrophoresis and protein identification by MALDI-TOF MS of the sucrose-untreated HIV-1 preparation. The spots 7, 8, and 25 were identified as cyclophilin A isoforms. (C) Electron micrographs of HIV-1 particles. The scale bar represents 50 nm.



## 2. 学会発表

- 1) 西牟田いくえ、三隅将吾、高橋一郎、高間みちは、高宗暢暁、庄司省三 HIV-1 粒子のプロテオーム解析による p24 アミノ末端ホルミル化の検出 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 317 (2002)
- 2) 三隅将吾、西牟田いくえ、高橋一郎、高間みちは、高宗暢暁、庄司省三 プロテオーム解析による 3 つの HIV-1 関連 cyclophilin A isoform の同定 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 316 (2002)
- 3) 西牟田 いくえ、三隅 将吾、高宗 暢暁、庄司省三 HIV-1 p24 アミノ末端のホルミル化の発見 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 746 (2002)
- 4) 三隅 将吾、西牟田 いくえ、高宗 暢暁、庄司省三 HIV-1 ライフサイクルに関与する 3 つの cyclophilin A isoform の同定 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 746 (2002)
- 5) 三隅将吾 プロテオーム研究の基礎と応用ープロテオームからみたエイズ研究ー第 26 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム 講演要旨集要旨集 10、(2002)

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究者報告書

16. 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

—HIV coreceptor を基礎にした吸着・侵入・増殖制御法の開発—

分担研究者 庄司省三 熊本大学・薬学部・生化学 教授

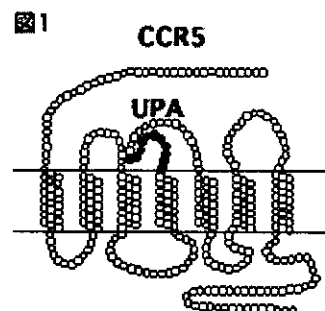
研究協力者 三隅将吾・高宗暢暁（熊本大学・薬学部・生化学）

研究要旨：HIV-1 coreceptor CCR5 の Arg168-Cys178 から構成される特殊立体構造を Undecapeptidyl arch(UPA)と名づけ、この特殊立体構造をミミックした Cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate(cDDR5-MAP)を調製した。この cDDR5-MAP 抗原をマウスに免疫して誘導される抗体は、細胞表面の native な human CCR5 を特異的に認識し、HIV-1R5 ウイルスの感染防止効果を示すことが明らかになっている。本年度は、よりヒトに近縁な霊長類であり、AIDS の動物モデルとして用いられるカニクイサルにおける cDDR5-MAP の抗体誘導活性を検討した。その結果、カニクイサルにおいても cDDR5-MAP 抗原は CCR5 の UPA を認識する特殊抗体を誘導することが認められ、免疫カニクイサル血清中の Ig fraction が、HIV-1R5 ウイルスに対し感染防止効果を示すことが明らかになった。cDDR5-MAP 抗原は、HIV-1 の感染を防止するワクチンとして有用であると考えられる。

A 研究目的

「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」の一貫として、分担研究者らは「HIV-1 coreceptor を基礎にした吸着・侵入・増殖制御法の開発」を遂行している。分担研究者らは、HIV-1 の侵入に必須な HIV-1 の coreceptor (CCR5)の第2細胞外 domain の一部を構成する特異的立体特殊構造(Undecapeptidyl arch : UPA)に注目し(図1)、この UPA domain を HIV-1 の侵入に必須な domain と考え、従来のワクチンの基本概念を逸脱して、生体の守りを

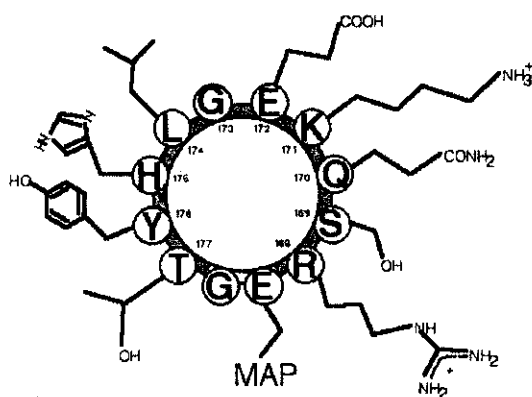
固め、ウイルス侵入を防止する手段を考案した。



この特殊構造を構成する 11 アミノ酸残基から Cys 残基を除いた 10 アミノ酸残基に、スペーサーアームジペプチド (Gly-Asp あるいは Gly-

Glu) を挿入して環状 dodecapeptide として再構築し、multiantigen peptide (MAP) に結合させ、免疫抗原として用いた(図1)。この抗原(ワクチン)によって誘導される特殊抗体はウイルスの侵入から生体を守る能力を有すると考えられ、HIV-1 coreceptor を基礎にした吸着・侵入阻止法の開発及び増殖制御法の開発のための研究を遂行することによって、所期の目的である「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」を達成することができる。

図2 cDDR5-MAP



## B 研究方法

### 1) cDDR5-MAP の調製

HIV-1 coreceptor CCR5 の Arg168-Cys178 から構成されるペプチドから Cys を除き、スパーサーアームジペプチド (Gly-Asp あるいは Gly-Glu) を挿入してペプチド合成機で合成した後、同ペプチドの head and tail の酸・アミド結合を介して環状させ、スパーサーアームジペプチドのカルボキシル基と MAP のアミノ基を結合させたのち、脱保護をして cDDR5-MAP を調製した。

### 2) カニクイサルに対する免疫

B virus, SVV, SRV, STLV 抗体陰性カニクイサル(中国産) 4歳、オス、体重 2.9~3.6 kg、6

頭(cDDR5-MAP 免疫サル3頭 [No.4, 5, and 6]、コントロールとして MAP-免疫サル3頭 [No.7, 8, and 9]) を用いた。

アジュバントは Freund complete adjuvant (FCA) または Freund incomplete adjuvant (FIA) を用いた。

0 および 1 週後に 300 $\mu$ g の cDDR5-MAP または MAP 抗原とアジュバントとして FCA を含むエマルジョンを腹腔に注射し、6 週後に 300 $\mu$ g の cDDR5-MAP または MAP 抗原とアジュバントとして FIA を含むエマルジョンを皮下に注射した。初回免疫前(pre)、初回免疫 2, 4, 6, 8, 及び 10 週後(2w, 4w, 6w, 8w, and 10w, respectively) に採血を行い血清を分離し、抗血清として用いた。

## 3) 抗体の諸性質の検討

### 3-1 BIAcore 分析

採取した抗血清を、分子量 100,000 を cut off する Spectra/PorCE (maker) を用いて透析し、BIAcore 分析用アナライトとした。BIAcore 分析用センサーチップには、cDDR5 または cDDX4(CXCR4 の UPA を mimic した環状ペプチド)を用いた。他 BIAcore 分析操作はその instrumental manual に従った。

### 3-2 HIV-1 感染防止効果測定

ウイルスは HIV-1 JRFL 株 (R5 ウイルス) または HIV-1 LAV 株 (X4 ウイルス) を用いた。MAGIC-5 cell に対し、抗血清存在下あるいは非存在下 HIV-1(R5,X4 ウイルス)を感染させ、感染を示すブルー細胞数を顕微鏡下計測した (MAGIC-5 assay)。

## 4) 倫理面への配慮

実験動物に対する動物愛護上の配慮については、必ず所属施設の倫理委員会等の規約に基づいて本実験を行った。

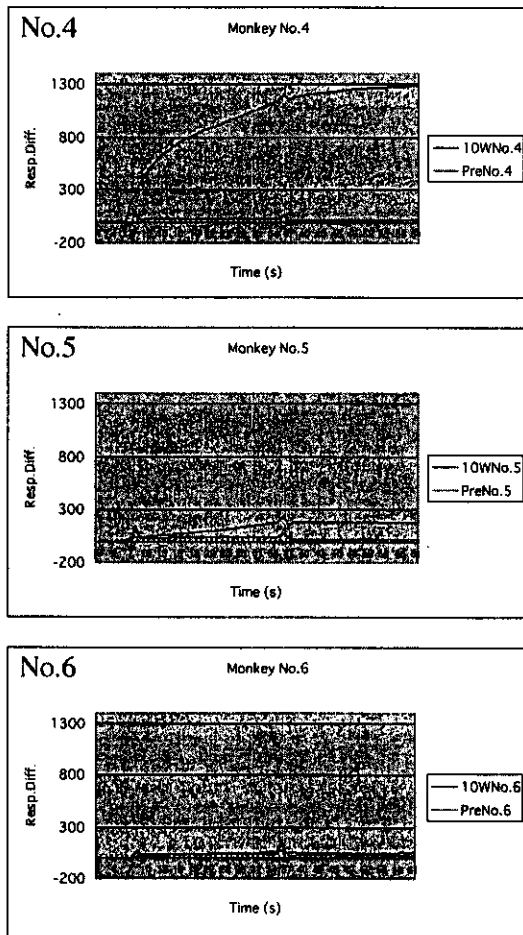
## C 実験結果

### 1) 抗血清の免疫学的諸性質

cDDR5-MAP 抗原を免疫したサル (No4, 5, and 6) 及び MAP 抗原を免疫したサル (No7, 8, and 9) の pre 抗血清およびの 10w 抗血清を透析(分子量 100,000 以下を cut off)処理したものをアナライトとし、cDDR5 または cDDX4 を結合したセンサーチップを用いて BIAcore 分析した結果を図 3 に示す。

### 図3 BIAcore分析

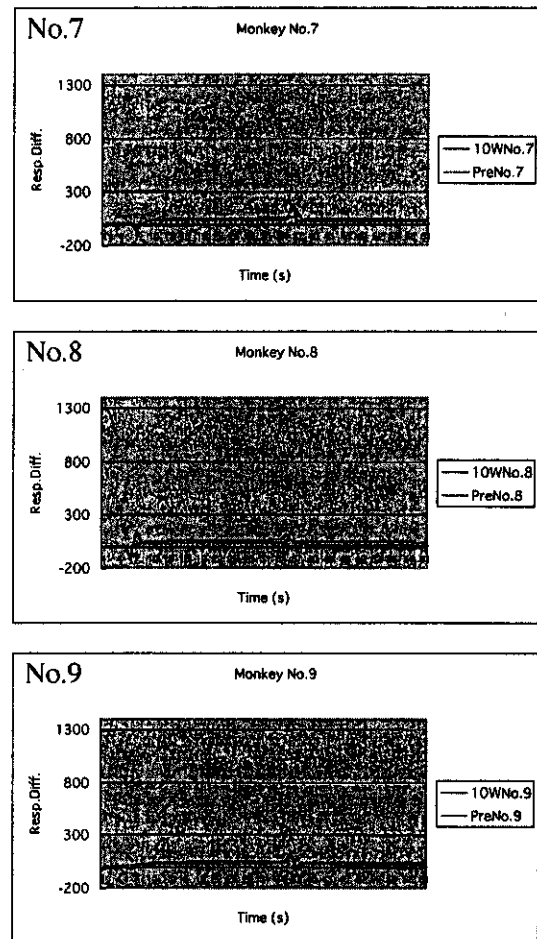
#### cDDR5センサーチップ



No. 4 サルと No. 5 サルの透析処理抗血清(pre 及び 10w)の分析の結果、cDDR5 センサーチップを用いた場合、10w において resonance unit (RU)の上昇が観察され、特に No.4 サルのそれは

著しかった。

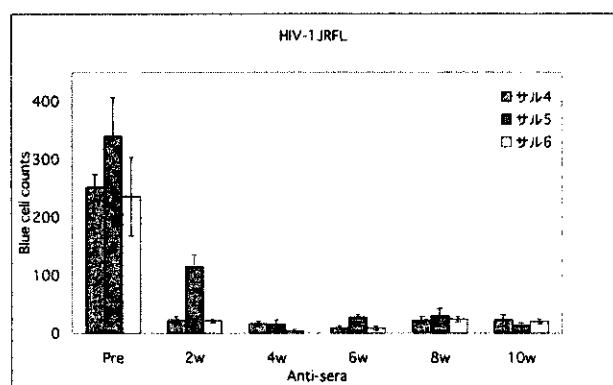
### 図 3 BIAcore 分析 (続き)



No 6 サルにおいては、cDDR5 センサーチップの応答は低かった。また、MAP 免疫サルである No. 7, 8, 及び 9 の透析処理抗血清(pre 及び 10w)を分析した結果、cDDR5 センサーチップの応答は観察されなかった (図 3)。一方、cDDX4 センサーチップは、全ての透析処理抗血清に反応しなかった (data not shown)。以上をまとめると、cDDR5-MAP 抗原を免疫したサル抗血清(10w)において、cDDR5 センサーチップに特異的に結合したことから、cDDR5-MAP 抗原がカニクイサルにおいて cDDR5 を認識する特殊抗体を誘導する活性を有することが示唆された。

## 2) 抗血清の抗 HIV 効果

次に、cDDR5-MAP 抗原を免疫した No.4, 5, 及び 6 サル抗血清(pre, 2w, 4w, 6w, 8w, and 10w) の HIV-1 (JRFL 株及び LAV 株) 感染防止効果を MAGIC-5 assay によって評価した。その結果、cDDR5-MAP 抗原を免疫した No.4, 5, 及び 6 サル抗血清は、R5 ウイルスである JRFL 株の感染を著しく阻害するのに対し(図 4)、X4 ウイルスである LAV の感染は有意に抑制しなかった。(data not shown)。



## D 考察

昨年度までに、分担研究者らは、CCR5 の UPA の立体構造をミミックした抗原ペプチド cDDR5-MAP を調製し、さらにこれを免疫抗原としマウスを用いて作出した単クローン抗体が、細胞表面の native な human CCR5 に特異的に結合し、HIV-1 R5 ウイルスである JRFL 株の感染を阻害する活性を有することを明らかにした。この結果から、cDDR5-MAP が、CCR5 を認識し HIV-1 R5 ウイルス感染を防御する抗 CCR5 抗体を誘導する特性をもつ抗原であることが明らかになった。

本年度は、よりヒトに近い霊長類であり、AIDS のモデル動物として用いられるカニクイサルにおいて、cDDR5-MAP が、CCR5 を認識し、さらに HIV-1 R5 の感染をブロックする抗体を誘導するかどうかを検討した。

FCA および FIA をアジュバントとして cDDR5-MAP を免疫したカニクイサルの透析処理抗血清(Mw100,000 cut off)は、BIAcore 分析の結果、cDDR5 センサーチップと特異的に結合したことから、抗血清中には cDDR5 に対する抗体の存在が示唆された。また、この抗血清は、HIV-1 R5 ウイルスの感染を著しく抑制したのに対し、HIV-1 X4 ウイルスの感染を有意に抑制しなかった。以上の結果は、マウスを用いた実験と一致する結果であった。これらの結果から、cDDR5-MAP は、カニクイサルにおいてもマウスの場合と同様に、CCR5 を認識し HIV-1 R5 ウイルス感染を防御する抗 CCR5 抗体を誘導する特性をもつ抗原であると考えられる。

1996 年 5 月に coreceptor の発見が報じられて以来、約 1 年後に HIV-1 coreceptor に変異を有するコーカサスの数%の人々は HIV-1 感染に対して抵抗性であることが遺伝子解析の結果判明した。また、イタリアにおけるコホート研究の結果、CCR5 に対する自己抗体保有者はセックスパートナーがエイズ患者にもかかわらず、HIV-1 に感染しないことが報告された。さらに、分担研究者らの報告に前後して、健康成人混合血清から CCR5 のペプチドに反応する IgG が HIV-1 の感染を防止したことが報告された。また、産経女性の血清には CCR5 に対する自己抗体が存在し、in vitro で HIV-1 R5 ウイルスの感染を防止することが報告され、CCR5 に対する自己抗体の誘導は HIV-1 R5 ウイルスの感染防止に極めて重要であると考えられる。

本研究で用いた cDDR5-MAP 抗原は、生体の守りを固め、HIV-1 の感染を防止するための自己抗体誘導ワクチンとして有用であると考えられる。今後、cDDR5-MAP 抗原を免疫したサルにおける SHIV (R5 ウイルス)感染ブロックの有無について調べる予定である。

E. 研究発表

論文発表

- 1) Shogo Misumi, Takashi Fuchigami, Nobutoki Takamune, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, and Shozo Shoji, *J. Virol.* 76,10000-10008. 2002
- 2) Takashi Fuchigami, Shogo Misumi, Nobutoki Takamune, Ichiro Takahashi, Michiho Takama, and Shozo Shoji. Acid-labile formylation of amino terminal proline of human immunodeficiency virus type 1 p24gag was found by proteomics using two-dimensional gel electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of flight mass spectrometry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1107-1113, 2002.
- 3) Nobutoki Takamune, Hirotoishi Hamada, Hideki Sugawara, Shogo Misumi, and Shozo Shoji. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of activity of myristoyl Coenzyme A: protein N-myristoyltransferase, *Anal. Biochem.* 309,137-142, 2002.
- 4) Nobutoki Takamune, Hirotoishi Hamada, Shogo Misumi, and Shozo Shoji, Novel strategy for anti-HIV-1 action: selective cytotoxic effect of N-myristoyltransferase inhibitor on HIV-1-infected cells. *FEBS Lett.*527,138-142, 2002.

学会発表

- 1) Shoji Shozo, Misumi Shogo, Nobutoki Takamune. A cyclic dodecapeptide-multiple-antigen peptide conjugate from

undecapeptidyl arch (from Arg168 to Cys178) of extracellular loop 2 in CCR5 as a novel HIV-1. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, August 24<sup>th</sup>-27<sup>th</sup>, 2002.10.1, P-124.

- 2) 中山 大介、向井 鎌三郎、石川 智美、橋 罔臣、梅田 衛、本田 徹朗、高宗 暢暁、三隅 将吾、庄司 省三. Chemokine receptor, CCR5-CXCR4 chimera 抗原に基づいた conformational specific 単クローン抗体の免疫学的諸性質の検討. 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 395 (2002)
- 3) 飯干 高明、三隅 将吾、高宗 暢暁、向井 鎌三郎、石川 智美、橋 罔臣、梅田 衛、本田 徹朗、庄司 省三. HIV-1 coreceptor 由来環状 dodecapeptide (cDDR5)のウイルス感染防止免疫抗原としての検討. 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 396 (2002)
- 4) 遠藤 昌史、三隅 将吾、向井鎌三郎、石川 智美、梅田 衛、橋 罔臣、高宗 暢暁、庄司 省三. CXCR4 の特異的構造を基礎にした HIV-1 X4 ウイルスの感染防御法のアカゲザルでの検討. 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 396 (2002)
- 5) 庄司 省三、三隅 将吾、高宗 暢暁, HIV-1 coreceptor の特殊構造に立脚した HIV-1 の感染防御, 第 16 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 221 (2002)
- 6) 遠藤 昌史、三隅 将吾、高宗 暢暁、庄司 省三, ケモカインレセプター CXCR4 に対する立体特異的抗体の乳癌細胞および HIV-1 感受性細胞に対する作用, 日本薬学会生物系薬学部会企画ファーマ・バイオフォーラム 2002 講演要旨集, p44
- 7) 中山 大介、三隅 将吾、高宗 暢暁、庄司 省三, Chemokine receptor, CCR5 及び CXCR4

を基礎にした self-defense HIV vaccine 開発のための生化学的基礎研究日本薬学会生物系薬学部会企画ファーマ・バイオフィオーラム 2002 講演要旨集、p30

- 8) 中山 大介, 向井 鎌三郎, 橘 圀臣, 梅田 衛, 高宗 暢暁, 三隅 将吾, 庄司 省三, Chemokine receptor, CCR5 及び CXCR4 を基礎にした self-defense vaccine 開発のための生化学的基礎研究, 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 839 (2002)
- 9) 飯干 高明, 三隅 将吾, 高宗 暢暁, 庄司 省三, Chemokine receptor, CCR5, の細胞外第 2 ドメイン由来環状 dodecapeptide(cDDR5) の抗 HIV 活性, 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 839 (2002)
- 10) 遠藤 昌史, 三隅 将吾, 高宗 暢暁, 庄司 省三, ケモカインレセプター CXCR4 に対する立体特異的抗体の乳癌細胞および HIV-1 感受性細胞に対する作用, 第 75 回日本生化学会大会発表抄録集 839 (2002)

#### F. 知的所有権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

庄司 省三 環状ペプチド及びエイズワクチン

出願人：日水製薬株式会社

国際公開番号、出願番号：WO00/47609、  
PCT/JP99/06174

出願日：1999年5月11日

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他

17. 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

分担研究者 田代 啓 京大・遺伝子実験施設・助教授

研究要旨

SDF-1 は、補助受容体 CXCR4 の生理的リガンドである。我々はこれまでにエイズ患者血中 SDF-1 濃度程度の SDF-1 が CD4 細胞上の CXCR4 発現量を制御し得ることを初めて動物体内で実験的に示している。本研究は、1. 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研究を行うとともに、2. HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物について検討をして、以下のように実験して重要な結果を得たので報告する。1. については、現在、我々の SDF-1 測定法に最適化した採血方法で新たに、共同研究者である米国 NCI の S. O'Brien 博士らのグループが米国で採血した HIV-1 感染者の血液中の SDF-1 量を測定し、血中 SDF-1 量と従来の CD4 細胞数や血中 viral load では予測し得ない「エイズ随伴症候群出現」と「患者体内での HIV ウイルスの指向性変化」等のパラメーターとの相関の有無を検討中である。2. については、in vitro 感染実験により、新規小分子量化合物が、細胞毒性を発揮するより低い濃度で、X4 ウイルスと R5 ウイルスの両方の増殖阻害することを見出した。

A. 研究目的

エイズ対策の医療と行政に寄与するための HIV 感染症の理解と制御には、細胞表面の吸着の制御の理解が重要である。本研究では、1. 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研究を行うとともに、2. HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物について検討することを目的とした。

1. 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の研究では、従来の CD4 細胞数や血中 viral load では予測し得ない「エイズ随伴症候群出現」と

「患者体内での HIV ウイルスの指向性変化」等のパラメーターとの相関の有無を検討することを目的とした。2. HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物についての研究では、in vitro 感染実験により、どの指向性をもつウイルスの増殖阻害をするかを解明することを目的とした。

B. 研究方法

1 の 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の研究では、我々の SDF-1 測定法に最適化した採血方



法で新たに、共同研究者である米国 NCI の S. O'Brien 博士らのグループが米国で採血した HIV-1 感染者の血液中の SDF-1 量を測定した。2 の HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物についての研究では、in vitro 感染実験により、どの指向性をもつウイルスの増殖阻害をするかを検討した。

#### <倫理面への配慮>

インフォームドコンセントをとり、匿名化を行い、日米両方の研究機関の倫理委員会の審査を経て承認を得ている。

#### C. 研究結果

研究目的 1 については、試料の測定をすすめた。共同研究者である米国 NCI の S. O'Brien 博士らは、充分大規模な数の測定を終えてから統計解析する研究スタイルなので、測定途上にある現時点では統計解析を行っていない。2 については、in vitro 感染実験により、新規小分子量化合物が、細胞毒性を発揮するより低い濃度で、X4 指向性ウイルスと R5 指向性ウイルスの両方のウイルス増殖を阻害することを見出した。

#### D. 考察

1 については、十分な試料数の測定を終えた時点で統計解析して結論を得ることができる。2 については、in vitro 感染実験により、新規小分子量化合物が、X4 指向性ウイルスと R5 指向性ウイルスの両方のウイルス増殖を阻害することから、

a. CXCR4 と CCR5 の両方に結合している可能性と、b. CD4 に結合している可能性と、c. gp120 などウイルス側に結合している可能性があり、今後の興味深い検討課題である。

#### E. 結論

1 の 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の研究では、順調に試料中の SDF-1 濃度測定を進めた。

2 の HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物についての研究では、X4 指向性ウイルスと R5 指向性ウイルスの両方のウイルス増殖を阻害することが判明した。研究進展が望まれる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

1.論文発表 なし

2.学会発表

池川 雅哉, 松本 和子, 本庶 佑・田代啓・「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」・第 5 回 CREST シンポジウム単一分子・原子レベルの反応制御・平成 15 年 1 月

#### 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

18. 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

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部 室長

研究要旨 HIV-1 の複製過程のうち発芽前後のゲノム RNA の性状を調べたところ、粒子中で著名にフラグメント化していることが判明した。HIV-1 のゲノム RNA は発芽と共にゲノム RNA の切断がループ部分で生じると考えられた。さらに宿主 topoisomerase I はループへ結合し、ニックを再結合することにより、逆転写を活性化すると考えられた。

A. 研究目的

HIV-1 と宿主因子の不可欠な相互作用はウイルス複製を抑制する標的として有用であると考え、HIV-1 の複製過程において重要な役割を果たす宿主因子を明らかにしていくことを目的とした。複製過程においてゲノム RNA の性状変化を調べ、修復宿主因子として topoisomerase I を解析した。

B. 研究方法

HIV-1 のゲノム RNA は細胞内では安定性が高いことが知られている。ゲノム RNA を細胞内と発芽後の粒子から抽出し、状態を調べた。またゲノム RNA の修復に関して、影響を及ぼすと考えられる宿主 topoisomerase I の作用を解析した。

(ア) 細胞内 HIV-1 ゲノム RNA と粒子中のゲノム RNA をノーザンブロットにより比較した。

(イ) 粒子中のゲノム崩壊を説明するために、HIV-1 のゲノム RNA のうち 2 次構造をとりやすいところを選び、T7 RNA ポリメラーゼを用いて合成し解析した。

(ウ) 切断が RNA のどのような構造で生じているか、一本鎖を特異的に切断する RNase I を使用してしらべた。

(エ) ステムループを形成する RNA に topoisomerase I が結合するかどうか調べた。

(オ) 切断が生じた RNA を topoisomerase I が再結合できるかどうかを調べた。

(カ) HIV-1 産生細胞へ topoisomerase I のミュータントを発現させ、感染性への影響を調べた。p24 の抗原量で平均化したウイルスを CD4 および CXCR4 を発現する HeLa 細胞へ感染させ、48 時間後に LTR に直結したガラクトシダーゼを指標として感染価とした。

本研究では特に臨床試料を使用していない。

C. 研究結果

(ア) 細胞由来のゲノム RNA からは約 9.7 knt の全長の mRNA を抽出することができた。対照的にウイルス粒子から得たゲノム RNA は変性ゲル中でスメアにしか検出することが

できず、フラグメント化していることが判明した。

- (イ) gag の C 末に近い p7 の領域を合成した RNA は NCp7 (HIV-1 RNA 結合タンパク) や、BSA、デタージェントの存在下に 10ヶ所の CA または UA 間で著名に切断されることが判明した 図 1。
- (ウ) RNase I の切断に対し、感度が高いところと、低いところがあり、ステムループ構造を形成していることが示唆された。再現させた切断はステムループ構造の一本鎖上で生じていることがわかった 図 2。
- (エ) topoisomerase I の野生株、ミュータント (Y723F, K532A) は同様にステムループへ結合することが判明した。これらの結合は SDS 処理やタンパク分解酵素 (PK) で消失したため結合には共有結合を含まないことが判明した。またステムループ状のより短い RNA(21nt)に対しても同様に結合することができた 図 3。
- (オ) 再結合活性を有するミュータント (Y723F) は野生株と同様に再結合を行い、消失したミュータント (K532A) は再結合させることができなかった。
- (カ) RNA の再結合能を有する野生株、Y723F を含むウイルスの感染価は再結合能を失ったミュータント R488A および、K532A を発現させた細胞由来のウイルス感染価の 4 倍程度を示した。このことはウイルスへ取り込まれた topoisomerase I

の再結合活性が HIV-1 の切断したゲノム RNA の修復に必要であったことを示唆した。

#### D. 考察

RNA のループ構造は topoisomerase I の認識する構造であり HIV-1 の RNA ゲノムも同様に認識されると考えられる。RNA のループ部分の一本鎖部分の特に CA または UA は切断しやすい。topoisomerase I は修復させることができると考えられた。この機構は標的細胞での cDNA 合成時に必要となることも判明した。本機構を標的とした阻害剤の選択はウイルス因子と宿主因子の相互作用を標的とする、耐性株の出現しにくい抗 HIV-1 剤開発へつながっていくと考える。

#### E. 結論

HIV-1 のゲノム RNA は発芽と共にループ部分で切断が生じると考えられるが、宿主 topoisomerase I によって修復され、逆転写を含む複製が円滑に進む機構があることが想定された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. **Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, T. Sata, W. Hall, and T. Kurata.** 2002. Binding and dissociation of human topoisomerase I with hairpin-loop RNAs: implications for the regulation of HIV-1 replication.

- Biochem. Biophys. Res. Commun.  
297:593-599
2. **Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, T. Sata, W. W. Hall, K. Nagashima, and T. Kurata.** 2002. Reconstitution of cleavage of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) RNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**:1084-1091
3. **Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, Y. Shoya, T. Sata, W. W. Hall, K. Nagashima, and T. Kurata.** 2002. Topoisomerase I and ATP activate cDNA synthesis of human immunodeficiency virus type 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**:509-517
4. **Hasegawa, H., Tatsumi, M., Ogawa-Goto, K., Takahashi, H., 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 Research and Human Retroviruses*, **18**:1253-1260, 2002.
5. **Okada, Y., H. Sawa, S. Endo, Y. Orba, T. Umemura, H. Nishihara, A. C. Stan, S. Tanaka, H. Takahashi, and K. Nagashima.** 2002. Expression of JC virus agnoprotein in progressive multifocal leukoencephalopathy brain. *Acta Neuropathol. (Berl)* **104**:130-136
6. **Hasegawa, H., S. Kadowaki, I. Watanabe, H. Aizawa, H. Takahashi, T. Iwasaki, S. Tamura, T. Kurata, and T. Sata.** 2002. Persistent infection of influenza virus in irradiated mice and its prevention by intranasal vaccination. *Vaccine* **20**:1050-1057
2. 学会発表  
高橋秀宗、前田才恵、倉田毅、佐多徹太郎 HIV-1 ゲノム RNA 安定性調節と複製機構 第 50 回 日本ウイルス学会総会 2002
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
1. 特許取得 特になし  
2. 実用新案登録 特になし  
3. その他  
『AIDS 治療薬のスクリーニング法』  
平成 14 年 7 月 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。