

図1 合成 p7 領域 RNA の切断点

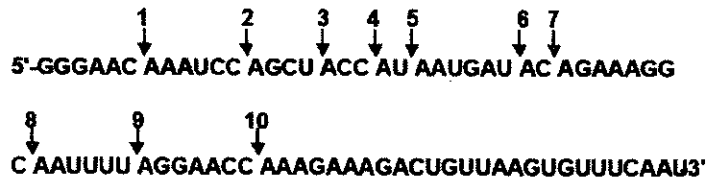


図2 切断点と RNA 構造の関係

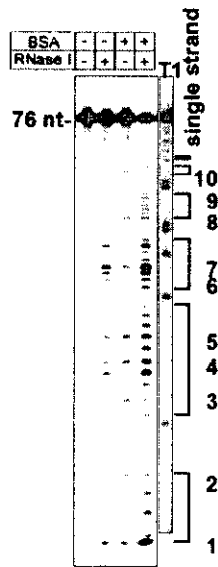
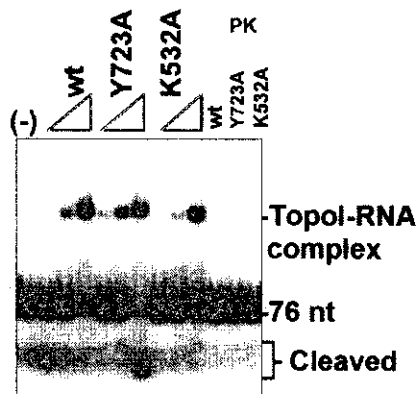


図3 Topoisomerase I の RNA への結合



19. HIV ゲノムの二量体化に関する研究

分担研究者 櫻木淳一（大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野）

研究要旨

HIV-1 ゲノムのパッケージングシグナル及び二量体化シグナル（E/DLS）を含むと考えられる領域をゲノム RNA 上に複数配置することにより、HIV-1 正常粒子中に単量体化したゲノムが生成することを見いだした。この現象を応用して構築した、ゲノム二量体化を効果的に検出できるシステムを用いて二量体化領域の構造についての詳細な機能相関を明らかにすることに取り組んだ。その結果ゲノム二量体化という現象がゲノムのウイルス粒子へのパッケージングに必須の 1 ステップであるという新しい可能性を強く示唆するデータを得た。

A, 研究目的

HIV-1 を含むレトロウイルスのポジティブ一本鎖 RNA ゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成している。これは遺伝子組替えによって子孫に遺伝的多様性をもたらし、また片方のゲノムが傷ついていた時の補償をすることで、生き残りに有利な状況を作り出していると解釈されている。したがって HIV ゲノム二量体化の機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としている HIV の制圧に向けた糸口を示しうる。現在までにゲノム上の二量体化シグナル（DLS）の同定は多くの場合人工的に合成した RNA を用いた試験管内の系により行われており、パッケージングシグナル内に存在することが示唆されてい

る(E/DLS 領域と総称する)。しかし実際のウイルス粒子中では多くの因子やイベントが存在しており、RNA と緩衝液のみからなる試験管内の系の結果がそのまま当てはまるとは限らない。しかし、DLS がパッケージングシグナル内に位置するという事は、ゲノム二量体化のウイルス粒子を用いての解析を困難にしている。それは二量体化の機能解析のために E/DLS へ変異導入をおこなうことは同時にパッケージング能へも影響を与えることになり、見える結果を単純に解釈できないからである。そこで、本研究では HIV-1 ゲノム二量体化をパッケージングと独立した形で粒子内でとらえることを目指し、E/DLS を含むと考えられる領域をゲノム上に複数個配置することによ

って起こる二量体の量的・質的变化について解析を行った。

B, 研究方法

1, DNA 構築

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。ゲノムの転写開始点から約500塩基分の DNA 断片を切り出し、polyA 付加シグナルとプライマー結合領域 (PBS) を不活化する変異を導入した (Δ P 断片)。pNL43 の Env 領域に Δ P 断片を挿入した変異体 pDDNBA を作成した。pDDNBA を母体として 5' 側の E/DLS に様々な変異を導入した一連の変異体を作成した。同時に導入変異のパッケージング能に対する影響をみるために pNL43 の Env 領域にフレームシフト変異を導入し Env の発現を失わせた変異体 pNLNh を母体として、これの 5' 側 E/DLS にも同様の変異を導入した一連の変異体を作成した。pNL43 のパッケージングシグナル付近 400 塩基と、Pol 領域 300 塩基を RNA 合成用ベクター pGEM3ZF(+) に挿入したプラスミド (pGEM600-1000, pGEMpol) を作成し、放射性リン標識 RNA プローブの鋳型とした。

2, ウイルスの精製

ヒト腎臓由来 293T 細胞にプロウイルス型 DNA をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。48 時間後に細胞上清に放出されたウイルス粒子をシュークローサクッションを通した超遠心にて回

収した。ウイルスの一部を界面活性剤にてウイルスを溶解、プロテイナーース K 処理、フェノール抽出にてウイルス粒子由来 RNA を精製した。トランスフェクトした細胞も同時に回収し、細胞質 RNA を精製した。ウイルス量は p24 抗原 ELISA キットにて定量した。ウイルスタンパクの性状は HIV-1 特異的抗体とウエスタンブロット法にて確認した。

3, ノザンハイブリダイゼーション

回収したウイルス RNA を 5 等分し、それぞれ 25, 35, 45, 55, 65°C で 10 分間加温したのち非変性 TBE アガロースゲルにて泳動した。ナイロン膜に電氣的に転写した後固定し、RNA プローブを用いて HIV-1 ゲノム RNA を可視化した。

4, RNase プロテクション

ウイルス RNA と細胞質 RNA 中の HIV-1 ゲノム RNA を RNA プローブを用いて RNase プロテクションアッセイキットにて定量した。

C, 研究結果

1, HIV-1 RNA 5' 領域各ステムループの二量体化・パッケージングに対する役割

HIV-1 の E/DLS 領域を、通常的位置に加えてもう一つゲノム上に持つ DDNBA より产生された粒子内のゲノムの二量体化度合いを野性株と比較した。野性株ではほぼ 100% のゲノムが非変性条件下で二量体化しているのに対し、DDNBA のゲノムは 40% 前後のゲノムが単量体とし

て存在していた。これは同一 RNA 上の二つの E/DLS の分子内反応により分子間での二量体形成が阻害された結果一部のゲノムが単量体化するためと考えられた。このことから、もし DDNBA の片方の E/DLS に変異導入を行い、それが二量体化を阻害する変異だった場合は粒子内の単量体形成が阻害される事が予想された。同時にその変異がパッケージング能に影響するものだったとしても変異導入していない側の E/DLS からパッケージング能は供給され、パッケージングへの影響は免れるため、この変異体の粒子内単量体形成の度合いを調べることで DLS をパッケージングシグナルと切り離して解析することが可能となると考えられた (図1)。まず DDNBA を母体に 5' 側の E/DLS に存在する RNA ステムループ群を一つずつ削除した変異体のゲノム二量体化を調べたところ、R/U5 ステムループ削除(dR/U5-BA)と PBS ループ削除(dPBS-BA)は二量体化に影響しない一方、U5/L(dU5/L-BA)と SL1 ステムループ削除(dM-BA)は粒子内単量体形成を著しく阻害し、これらの領域に DLS が存在していることが示唆された。

2, U5/L ステムループ領域の詳細な DLS 検索

U5/L 領域の DLS 領域の詳細な検索を行った。まずステムループ上端から段階的に上部ステム領域まで削除した3つの変異体(dLA1-BA, dLA2-BA, dLA3-

BA)を作成し、調べたところ、上部ステム削除は二量体化に影響しないことが明らかとなった。更に下部ステムを半分短縮した変異体(dLB2-BA)でも二量体化への影響はごくわずかであったが、下部ステムの 5' 側鎖のみの削除変異体(dLB3-BA)では二量体化効率が半分程度に、同じく 3' 側鎖のみの削除変異体(dLB4-BA)では 7-8 割の機能低下が起こった。そこで dLB4-BA の削除領域のうち dLB2-BA では削除していない部分 (10 塩基) だけを削除した変異体(dLC1-BA)の二量体化能低下は 6-7 割なのに対し、そこを上下 5 塩基ずつ削除した変異体(dLC2-BA,dLC3-BA)では両方とも4割前後の機能低下にとどまった。このことから U5/L ステムループ部ではもっとも下流側の 10 塩基が特にゲノム二量体化に重要な働きがあると考えられた。

3, SL1 ステムループ領域の詳細な DLS 検索

SL1 領域の DLS 領域の検索のために6つの変異体について検討した。SL1 は上端のヘアピンループ、それに続く上部ステム、バルジより下部のステム構造からなる。上部ステムを削除した変異体(dL1-BA)及びヘアピンループにある 6 塩基からなるパンドローム配列のうち 5 塩基を削除した変異体(BsS1-BA)では二量体形成能は約半分の低下であった。ヘアピンループのパンドロームを 4 塩基挿入により 10 塩基に延長した変異体

(BsT6-BA)、3塩基挿入によりパリンドローームを破壊した変異体(BsT2-BA)及び上部ステムの塩基対形成を阻害してステム形成を困難にした変異体(S1-BA)では二量体形成能の低下はほとんど見られなかった。結局 SL1 を全削除した変異体(dM-BA)以外ではすべての変異で二量体化能は残存した。

4. 一連の導入変異のパッケージング能に及ぼす影響

上記の 5'E/DLS 内への一連の導入変異をすべて、Env を失活させたプロウイルス型変異体(NLNh)に移植し、野生型プロウイルスとの競争的パッケージングアッセイによってパッケージング能の解析を行った。dPBS はパッケージング能低下が見られなかったが dR/U5, dU5/L, dM はパッケージング能がほぼ消滅した。dLA1, dLA2, dLA3 はパッケージングに影響しなかった。二量体化能にほとんど影響のなかった dLB2 ではパッケージング能は著しく低下した。dLB3, dLB4, dLC1 でもパッケージング能は大きく低下したが、二量体化能が半分程度の低下だった dLC2, dLC3 はパッケージング能も同様に半分程度の低下であった。SL1 内変異について二量体化能に影響の見られなかった3つの変異(BsT6, BsT2, S1)はパッケージング能を半分程度に低下させた。二量体化能が半分程度の BsS1 と dL1 はパッケージング能も半分程度、二量体化能が完全に失われた全削除変異(dM)ではパッケージング能もほぼ失われ

ていた。

D. 考察

HIVのウイルス粒子内でRNA一本鎖ゲノムは非共有的に結合した二量体として存在している。これによりウイルスは相同組換えによる遺伝的多様性の獲得や、ゲノム損傷の補償を行っていると言われる。しかしそれらの理由が二量体化という複雑で手間のかかるイベントを、物理的制約を抱えるウイルスが捨てずにいることを十分説明できるとは考えにくい。本研究でパッケージングシグナルは二量体化シグナルよりもずっと広い範囲に存在していること、二量体化能に重要な領域はすべてパッケージングにも重要であること、そして一部の領域ではこの二つの機能が相関していること(dLC1, dLC2, dLC3や、dM, dL1, BsS1の結果)が示された(図2)。このことはHIV-1のゲノムパッケージングというプロセスにおいて、E/DLS領域のRNAが二本結合して形づくる構造がパッケージングシグナルとして認識されるという段階が存在する可能性が考えられる。つまり本研究はHIV-1のゲノム二量体化は、複数のステップからなるゲノムパッケージングという機構のうちの必須な1ステップであるという可能性を強く示唆するものである。この仮説は長年の命題であった二量体化の理由に対する簡潔で合理的な説明となり得るものである。

E. 結論

HIV-1ゲノムRNA上のE/DLS領域をゲノムRNA上に複数配置することにより、HIV-1正常粒子中に単量体化したゲノムが生成することを見いだした。この現象を応用してウイルス粒子内でのゲノム二量体化をパッケージングと切り離して解析するシステムを構築することに成功した。解析の結果はゲノム二量体化がゲノムパッケージングの必須な一段階であることを示唆していた。

F, 研究発表

1, 論文発表

- 1) Jun-ichi Sakuragi, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. Dissociation of Genome Dimerization from Packaging Functions and Virion Maturation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. JOURNAL OF VIROLOGY, Feb. 2002, p. 959-967 Vol. 76, No. 3.
- 2) Jun-ichi Sakuragi, Shigeharu Ueda, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. Relationship between dimerization and packaging of HIV-1 genome RNA; a possible role of dimerization in genome packaging. JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2003, vol. 77, No. 7. in press.
- 3) 櫻木淳一 粒子としての HIV の成り立ちとふるまい ウイルス 2002 第 52 巻 p.95-102
- 4) 櫻木淳一 RNA を介した細胞の抗ウ

イルス戦略に関する最近のトピック RNA Network Newsletter in Press.

2, 学会発表

- 1) HIV-1 ゲノム二量体化及びパッケージングに関する解析 櫻木淳一 第 12 回日本抗ウイルス化学療法研究会、東京
- 2) THE RELATIONSHIP BETWEEN DIMERIZATION AND PACKAGING OF HIV-1 GENOME RNA; A POSSIBLE ROLE OF DIMERIZATION IN PACKAGING. Jun-ichi Sakuragi and Tatsuo Shioda, 2002 CSHL Retroviruses meeting, NY, USA.
- 3) HIV-1 ゲノム二量体化及びパッケージングに関する解析 櫻木淳一、塩田達雄、第 4 回 RNA ミーティング、つくば
- 4) HIV-1 ゲノム二量体化及びパッケージングに関する解析 櫻木淳一、塩田達雄 第 50 回日本ウイルス学会総会、札幌
- 5) HIV-1 ゲノム二量体化及びパッケージングに関する解析 櫻木淳一 シンポジウム、第 16 回日本エイズ学会学術集会、名古屋
- 6) 二重変異体を用いたシステムによる *invivo* での HIV-1 ゲノム RNA 二量体化の解析 櫻木淳一、塩田達雄 ワークショップ、日本分子生物学会 2002 年度年会、横浜

G, 知的所有権の取得状況
なし

図 1

パッケージング能に影響を与えない、 in vivoでのゲノム二量体化解析システム

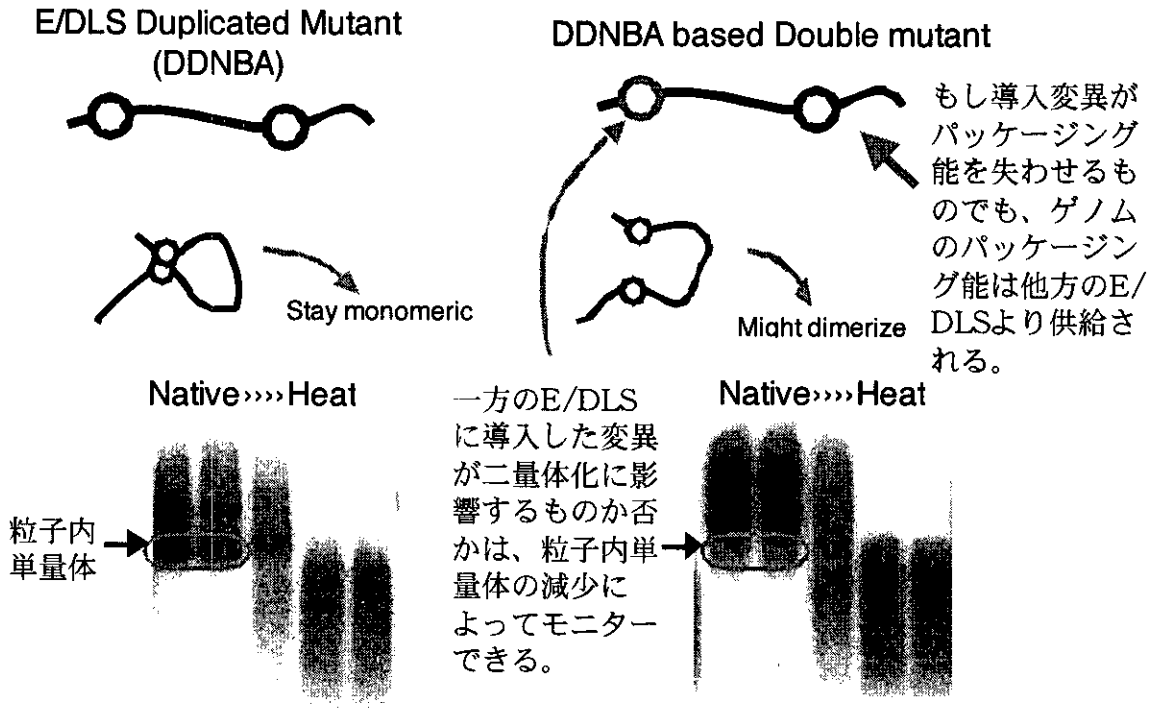
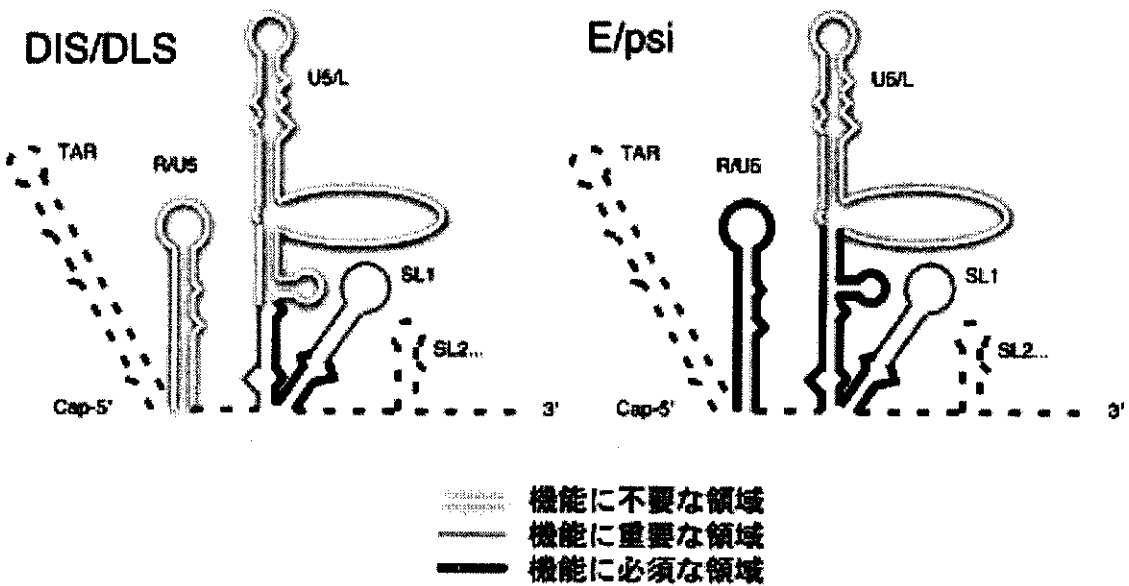


図 2



20. HIV-1 Vif タンパク質機能の分子機構に関する研究

協力研究者 明里宏文（国立感染症研究所 筑波医学実験用霊長類センター・エイズ研究センター）

研究要旨：HIV-1 Vif タンパク質のウイルス粒子内における役割を検討した結果、Vif タンパク質はウイルスプロテアーゼによる Gag 前駆体の第一切断部位を特異的に阻害し、それによって capsid-p2-nucleocapsid からなる Gag 中間体が生成されること、さらにこの中間体は、Vif タンパク質と共に nucleoprotein complex に局在することが明らかとなった。本研究結果は、Vif によるウイルス感染性制御機構の解明に重要な知見となるとともに、ウイルス成熟過程を阻害する新規抗 HIV 薬の開発に資すると考えられた。

A. 研究目的

Vif タンパク質は、HIV-1 の感染性を増強することによりウイルス複製効率を左右する重要な調節タンパク質である。最近の我々の研究より、Vif タンパク質が viral genomic RNA 依存性に nucleoprotein complex としてウイルス粒子にパッケージされること、さらにウイルスプロテアーゼによりその一部が特異的領域で切断されることが明らかとなった (Journal of Virology 75, 7252-65, 2001; Journal of Virology 76, 9112-23, 2002)。これらの結果より、Vif タンパク質がウイルス粒子内で、ウイルス感染性に関わる何らかの機能を発現していることが推察された。そこで本研究では、Vif タンパク質によるウイルス粒子構成タンパク質への影響についてより詳細に明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HIV-1 感染性分子クローンである pNL4-3 及び Vif タンパク質発現ベクターである pNL-A1 または Gag 変異体である pNL43-CA2 をエレクトロポレーション法により H9 細胞へ遺伝子導入し、24時間後ウイルスおよび導入細胞を回収した。ウイルスタンパク質は Western blotting 法により解析を行った。また得られたウイルスは、Triton X-100 処理後シヨ糖不連続密度勾配法により分画化した後、同様に Western blotting 法により解析を行った。

C. 研究結果

Vif タンパク質発現ベクターである pNL-A1 を感染性分子クローンである pNL4-3 (またはその vif 欠損変異体) と共に Vif 要求性細胞である H9 細胞へ co-transfection することにより、ウイルス産生細胞へ Vif タンパク質を過剰量発現させることが出来た (Fig.1A)。この細胞より産生されたウイルスを回収して Western blotting により解析を行った結果、AIDS 患者血清に反応する 33,34kD のバンドが検出された (Fig.1B)。このバンドは抗 p24CA 抗体及び抗 p7NC 抗体でも検出されたことから CA-p2-NC±p1 からなる Gag 中間体であることが明らかとなった (Fig.1C)。一方、抗 p17MA 抗体や抗 RT 抗体では異常なプロセッシング産物は認められなかったことから (Fig.1C)、Vif タンパク質はプロテアーゼ阻害効果を示すのではなく、特定の切断部位を特異的に阻害していることが示唆された。

重要なことに、primary cleavage site である p2-NC 間での切断が著明に阻害されていることが知られている CA2 変異体由来ウイルスにおいて、同様な CA-p2-NC から成る Gag 中間体が検出された (Fig.2)。このことから、Vif タンパク質は p2-NC 間でのプロテアーゼによる Gag 切断を特異的に阻害することが強く示唆された。さらに、CA2 変異体を pNL4-3 wild-type と種々の比率にて H9 細胞へ遺伝子導入した場合、混和比 1 : 9 以下で得られるウイルスに

おける Gag 中間体は検出限界以下となった (Fig. 2)。ごく最近我々は、ウイルス粒子あたり 50~100 分子の Vif タンパク質がパッケージされることを報告した (J Virol 77, 1131-40, 2003)。ウイルス粒子あたりの Gag タンパク質を 2000 分子とすると、Vif:Gag 比は 1:20~40 となる。CA2 変異体による実験結果と併せて考えると、正常な感染性 HIV-1 において上記のような Gag 中間体の存在がこれまで発見されなかったのは、アッセイ系の検出感度の問題によるものと考えられた。

次に、上記のウイルスを nucleoprotein complex と可溶性成分に分画した後 Western blotting にて解析を行った結果、Gag 中間体 p33/34 及び Vif タンパク質は nucleoprotein complex に共局在していることが示された (Fig.3)。興味深いことに、この中間体の分解産物である CA, NC はその大半が可溶性分画に存在していた (Fig.3)。このことから、この中間体はその分解産物である CA, NC と比較して遙かに強く viral genomic RNA と結合していると考えられた。

D. 考察

昨年の Malim らのグループによる HIV-1 抑制性宿主因子 CEM-15 の発見にも関わらず、Vif 及び CEM-15 の作用機序は現在まで不明である。本研究の実験結果より、Vif タンパク質は CEM-15 のインヒビターとしての作用以外にウイルス粒子中で Gag 前駆体のプロセッシングを調節していることが明らかとなった。他のアクセサリータンパク質ですでに知られるように、Vif タンパク質も複数の機能を有することは想像に難くない。

以前 Vif タンパク質は Gag 前駆体と NC 領域で結合することが報告されている。このことから Fig.4 に示したように、Vif タンパク質が Gag 前駆体と結合することによりプロテアーゼの p2-NC 領域へのアクセスが阻害され、その結果 Gag 中間体が産生されることが考えられた。

Gag 中間体 p33/34 及び Vif タンパク質は nucleoprotein complex に局在していることから、逆転写過程または RNA 安定性に関与することでウイルス感染性に影響することが示唆された (Fig.4)。

今後は、(i) Gag 中間体及び Vif タンパク質の nucleoprotein complex における機能的役割、および(ii) Vif タンパク質による Gag 前駆体のプロセッシング調節の分子機構を明らかにすることにより、感染性 HIV-1 粒子形成における Vif の分子機構を解明出来るとともに、ウイルス成熟過程を阻害する新規抗 HIV 薬の開発に繋がるものと期待される。

E. 結論

本研究では、HIV-1 Vif タンパク質がウイルス粒子中で Gag 前駆体のプロセッシングを調節していることを初めて明らかにした。また、この結果 capsid-p2-nucleocapsid からなる Gag 中間体が生成され、Vif タンパク質とともに nucleoprotein complex に局在することを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Tomiyama H, Akari H, Adachi A, Takiguchi M: Different effects of Nef-mediated HLA class I down-regulation on HIV-1-specific CD8+ T cell cytolytic activity and cytokine production. Journal of Virology 76, 7535-7543, 2002.

(2) Khan MA, Akari H, Kao S, Aberham C, Davis D, Buckler-White A, Strebel K: Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease and its possible correlation with Vif function. Journal of Virology 76, 9112-9123, 2002.

(3) Kao S, Akari H, Khan MA, Dettenhofer M, Yu X-F, Strebel K: Human immunodeficiency virus type 1 Vif is

efficiently packaged into virions during productive but not chronic infection, *Journal of Virology* 77, 1131-1140, 2003.

(4) Sugimoto C, Tadakuma K, Otani I, Moritoyo T, Akari H, Ono F, Yoshikawa Y, Sata T, Izumo S, Mori K: *Nef* gene is required for robust productive infection of simian immunodeficiency virus in T-cell-rich paracortex in lymph nodes. *Journal of Virology* 2003, in press.

2. 学会発表

(1) Akari H, Bour S, Kao S, Strebel K: The HIV-1 Vpu induces apoptosis by suppressing the NF- κ B-dependent expression of anti-apoptotic factors. Keystone Symposia, Colorado, USA. April 5-11, 2002.

(2) Khan MA, Kao S, Akari H, Davis D, Buckler-White A, Strebel K: Intravirion processing of the HIV-1 Vif protein by the viral protease. Keystone Symposia, Colorado, USA. April 5-11, 2002.

(3) Akari H, Kao S, Khan MA, Strebel K: Regulation of viral infectivity by HIV-1 Vif: more is not always better. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.

(4) Kao S, Akari H, Khan MA, Strebel K: HIV-1 Vif is efficiently packaged into virions during acute but not chronic infection of H9 cells. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.

(5) Khan MA, Akari H, Kao S, Davis D, Strebel K: Intravirion processing of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein by the viral protease: implications for viral infectivity. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses. New York, USA. May 21-26, 2002.

(6) 明里宏文、足立昭夫：HIV-1 Vif 蛋白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、平成 14 年 10 月。

(7) 明里宏文、足立昭夫、Klaus Strebel: 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・シンポジウム 5 「HIV 形態形成に関する基礎研究の進歩」。名古屋、平成 14 年 12 月。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

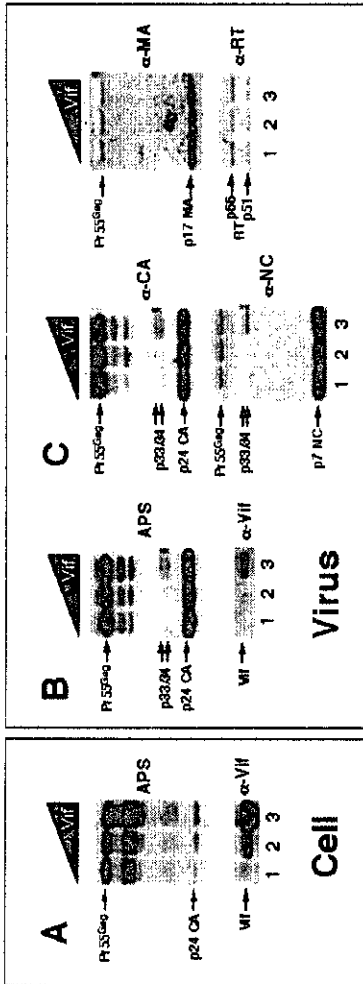


Fig. 1. High level expression of Vif in H9-derived virus preparations reveals an effect of Vif on Gag maturation that is evident by the appearance of 33/34 kDa Gag intermediates.

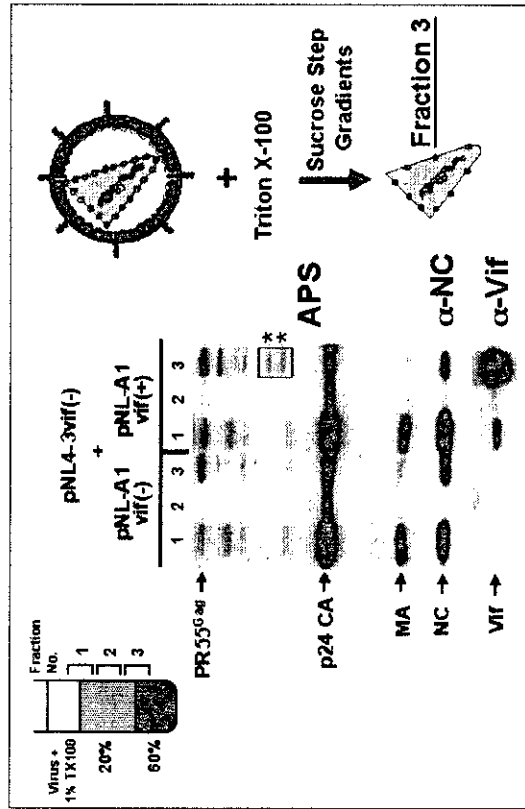


Fig. 3. Vif and p33/34 Gag intermediates are colocalized in the viral nucleoprotein complex.

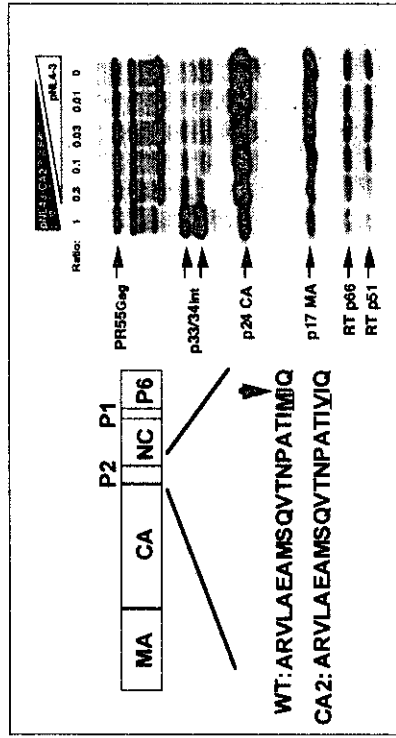


Fig. 2. Effect of defective mutation in primary cleavage site at p2-NC on Gag maturation.

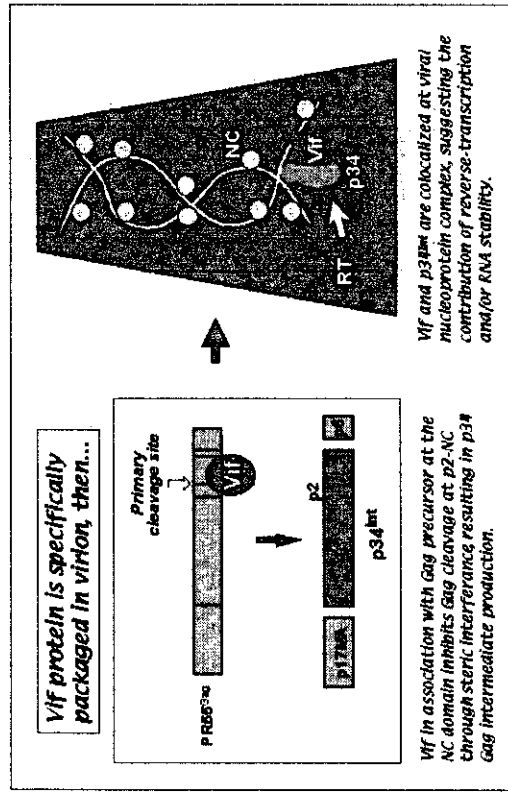


Fig. 4. Model for the functional role of Vif protein in virion.

21. HIV-1 subtype A 感染性分子クローンの分離とその構造

分担研究者：巽 正志（国立感染症研究所獣医科学部）

共同研究者：松田道行（大阪大学微生物病研究所）

草川茂、武部豊（国立感染症研究所エイズ研究センター）

研究要旨 1992 年 Uganda で分離され、gag と env 領域から subtype A と判定された HIV-1 2 株から MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた HIV Trapping System で感染性 DNA クローンを 4 クローン得た。全塩基配列を決定し近隣結合法により系統樹を作成したところ全て Subtype A1 に帰属した。全てのクローンは PBMC で増殖し、CCR5 Tropism を示した。全世界の感染者数が subtype C に次いで多いとされ、様々な組換え流行株の母体となっている HIV-1 subtype A の感染性分子クローンの分離に世界に先駆けて成功した。

A. 研究目的

現在までの HIV 研究は主に欧米に流行している subtype B の Molecular clones を用いてその病原性を担う遺伝子領域が検索されてきた。しかしながら最近の HIV-1 の感染中心は欧米からアフリカ、東南および南アジア地域に移行しており、そこで主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype C, subtype A, CRF01_AE および CRF02_AG 組換体が多くを占めている。HIV-1 subtype B は異性間の感染も認められるが主に homosexual および麻薬静注者などの risk group に侵淫していることが知られている。一方、Subtype 間における感染経路による感染効率の違いが指摘されているにもかかわらず、subtype B 以外の感染性クローンが得られていないため、その違いに由来する HIV-1 subtype 間の遺伝子構成の相違に基づく病原性解析の進展における隘路になっている。本研究は subtype B 以外の発展途上国で流行している subtype の感染性クローンの樹立を試み、将来のワクチン開発および subtype によるウイルスの病原性解析の分子基盤を整備す

ることを目的とする。

昨年度までの本研究班で、感染者数をもっとも多い Subtype C および西・中央アフリカにおいて爆発的に感染者が増加している circulating recombinant form (CRF02_AG) の感染性分子クローンの分離を報告したが、感染者数が Subtype C に次いで多い subtype A のクローン分離樹立には至らなかった。そこで本年度は最近の西・中央アフリカ流行地における分離株の多くは CRF02_AG 組換体であることから、新たに 1992 年度まで遡って Subtype A と判定された分離株を入手してヒト PBMC で感染増殖するクローンの樹立を目指した。

B. 研究方法

HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告した HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系(HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系)により行っ

た。対象としたウイルスは AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH, USA から分与を受けた 1992 年に HIV-1 subtype A の流行地域である Uganda で分離された 92UG029 と 92UG031 である。まず検体を MAGIC-5A 細胞でブランク純化した。得られたウイルスを感染させた HeLa4.5 細胞(CD4 および CCR5 発現 HeLa 細胞株)からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として、Long PCR を行い 5'-および 3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長の DNA クローンを得た。完全長 DNA クローン作製の戦略は当初先に報告した 5'-LTR から PBS までを予め pBR322 ベースの Cloning Vector pMT1 に組み込み、その Kas I 部位から 3'-LTR の PolyA signal 下流までを Not I 部位を付け加えた Primer で増幅した 9.0 Kbp に及ぶ Long Amplicon を制限酵素処理精製後組み込む方法を用いて樹立した。50 クローンに及ぶ Transfection で HeLa4.5nEGFP 細胞に Syncytium 形成陽性のクローンは得られるものの、感染性を MAGIC-5A 細胞で確認出来たクローンは得られなかった。そこで改めて HIV-1 sequence database に当たり、HIV-1 genome の中間点近傍に適切な制限酵素部位を挿入し 2 fragments cloning 戦略も併せて試みた。

C. 研究結果

ブランク純化した HIV-1 92UG029 と 92UG031 株を感染させた HeLa4.5 細胞ゲノムを鋳型に 5'-LTR から PBS までの Short Genome を pBR322 由来 Vector pMT1 に組み込み、PBS 領域近傍の多くの HIV-1 で保存されて、なおかつ Unique Site ある Kas I/Nar I と Rare Cutter

Not I を利用して 9.0 Kbp に及ぶ Near-Full Length genome を Long PCR で増幅し、両制限酵素で処理した後組込んだ。組み込まれた Plasmid を、Tat 蛋白発現により核移行シグナルを付加した EGFP を HIV-LTR 下流に組み込んだ発現ユニットを有する細胞株 HeLa 4.5/nEGFP に Transfection 2 日後核仁に EGFP 発現陽性で Syncytium 形成が陽性にできる 50 に及ぶクローンを選択した。しかしながらその培養上澄には、p24 抗原が陽性であるのにも拘わらず次の MAGIC-5A 細胞への感染性をもつウイルス粒子は得られなかった。Monitor 細胞株 HeLa 4.5/nEGFP で EGFP 陽性で、Syncytium 陽性なことから Tat, Rev および Env 蛋白は有効に機能していることが推察されることから、構築した全長ゲノム Plasmid の右半分はその Functionality が保存されていると考えた。そこで左半分のゲノムの入換え戦略をとったが幾度もの試みでも感染性クローンは得られなかった。そこで改めて HIV-1 sequence database に当たり、HIV-1 genome の中間点近傍に適切な制限酵素部位を検索し、一方 Long Amplicon を切断しない 6 塩基以上を認識する制限酵素を探した。その結果 HIV-1 92UG029 と 92UG031 株で BamHI で切断されず、Subtype A tat 領域 コンセンサス配列 ATGGAGCCAGTAGATCCTAACCTAGAGCCC TGGAAACCATCCGGGAAGTCAG の下線部位の A を T に変えることにより Tat 蛋白アミノ酸配列を変えることなく Unique site を挿入出来ることが判明した。そこで subtype A 5'-LTR 開始配列の上流に HIV-1 genome にはない Sal I 配列を加えた Forward Primer (UGALTR1+)/Sal I: CGGTCGACT GGATGGGTAAATTTACTCCA)

と上記の tat 領域の改変した Reverse Primer (UG-tat(-)/BamH I: TAGGATCTACCGGA TCCATCCCTGACTCTT)の組み合わせで 上流 半分の genome を増幅し、同様に BamH I 部位 を含む tat 領域の Forward primer (UG-tat(+)/BamH I: AAGAGTCA GGGATGGAT CCGGTAGATCCTA)と 3'-LTR PolyA signal 下 流領域 排列に Not I 部位を加えた Reverse Primer(LTR-R(-)/Not I: GCGCGGCCGCGCA CTCAAGGCAAGCT TTATTGAGGCT)で下流半 分の genome を増幅し順次 HIV-1 Cloning vector pMT1 に組み込む 2 Fragment Cloning により 92UG031 株から p92UG031-A1 および p92UG031-A2 を、92UG029 株 から p92UG029-A3 および p92UG029-A4 をそれぞ れ 2 クローン、合計 4 クローンの subtype A の 感染性クローンが得られた。

これらの感染性クローンの全塩基配列を決定し 遺伝子構造を解析したところ以下の事項が判明し た。

全長の系統樹

4 クローンの全塩基配列を決定し(92UG031-A1; 9616 bp, 92UG031-A2;9616 bp, 92UG029-A3; 9629 bp, 92UG029-A4; 9635 bp)、9つのウ イルス蛋白をコードするオープンリーディングフ レームが存在することを確認した。

他の代表的な Subtype の reference sequence との Alignment をもとに Kimura-2-parameter 法により genetic distance matrix をつくり、近 隣結合法にて系統樹を作成したところ、4クロー ンは subtype A と 100%の bootstrap 値でクラス ターを形成した(図1)。

Bootscanning Analysis

4クローンの Break Point の位置を比較する ために Bootsanning 解析を行った。500bp ご とのブーソトラップ系統樹から得られたブーソ トラップ値を 100bp 毎ずらして計算していきグ ラフにプロットした。グラフが上の方にあるほど、 そのサブタイプとの間で形成されるクラスターの 信頼性が高いことを示している。この解析によ り4クローンとも全長にわたり subtype A に帰 属し、Pure な subtype A クローンであることが 判明した(図2)。

感染実験

4クローンを 293T 細胞に FuGene 6 を用い ての transfection 2 日後の培養上澄には、感染性 クローン pBa-L,および我々が樹立した世界最初 の subtype C の感染性クローン pIndie-C1 と同 等な RT 活性を検出した。この培養上澄をウイル スストックして感染実験に用いたところ、PBMC 培養で増殖を認めた(図3)。一方、Coreceptor Usage を確かめるため、NP-2/CD4/CCR5 と NP-2/CD4 /CXCR4 細胞株を用いて検討した。 その結果、4クローンは全て CCR5 を Coreceptor として用いる R5 HIV-1 クローンであることが確 認された。

D.考察

本年度は、現在世界で subtype C に次いで感 染者数が多いとされる subtype A の感染性クロ ーンの世界に先駆けての樹立に成功した。今回の 成果により本研究では世界で流行している主要な Subtype 全てについて感染性クローンを樹立する ことが出来た。特に Subtype A は昨年度に報告

した西・中央アフリカにおける流行拡大の主要な原因ウイルスとして浸淫している CRF02_AG 組換体および東南アジアでの CRF01_AE 組換体のみならず様々な subtype と組換体を形成して該当地域の流行を形成していることが知られている。この事実は subtype A が他の subtype よりも Recombination をより起しやすい遺伝子構造を持つのか否か、感染性クローンが得られた現在解析可能な視野に入って来るものと考えられる。当初の本研究の目的であるより効率的な感染性クローン樹立法開発には依然検討の余地はあるが、世界に流行する主要な subtype 全ての感染性クローンが世界に先駆けて得られたことは subtype 間のウイルス学的生物学的性状の差異をその遺伝子構造に基づいて解析比較できるのみならず、それぞれの subtype に対するワクチン開発の基本的ツールが整備されたことを意味する。Subtype ごとに多様な遺伝子配列を持つ HIV-1 研究にはさらに多くの感染性クローンを必要とするが、取り掛かる最初の一步が踏み出されたものと考えられる。

E. 結論

感染者数が subtype C に次いで多く、アフリカを始めとして世界流行の形成に関与している subtype A の感染性分子クローンの分離に世界に先駆けて成功した。これまで分離樹立したクローンとともにワクチン開発等ウイルス学的解析に資するものと期待される。

F. 研究発表

(1) 発表論文

Takeuchi H., Suzuki, Y., Tatsumi M., Hoshino H., Daar E. S., Koyanagi Y. Isolation and characterization of an infectious HIV type 1: Molecular clone from a patient with primary infection. *AIDS Res Hu. Retroviruses* 18: 1127-1133, 2002.

Kusagawa S., Sato H., Tomita Y., Tatsumi M., Kato K., Motomura K., Yang R. and 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

Suzuki Y, Takeuchi H, Tatsumi M, Daar E.S., Miura Y, Ebina H, Misawa N, Yamamoto N and Koyanagi Y. Isolation of human immunodeficiency virus type 1 from acute infection and identification of major target cell as monocyte without exogeneous stimulation in vitro. *J.Virol.* in press

Sugiura, W., Matsuda Z., Yokomaku Y., Hertogs K., Larder B., Oishi, T. Okano A., Shiino T., Tatsumi M., Matsuda M., Abumi H., Takata N, Shirahata S, Yamada K., Yoshikura Y, and Nagai N. Interference between D30N and L90M in Selection and Development of Protease Inhibitor-Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 708-715., 2002

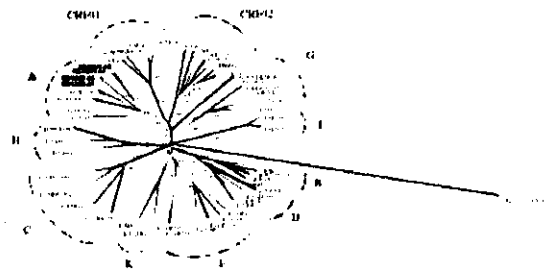


図 1 : 樹立した HIV-1 subtype A クローンの系統樹

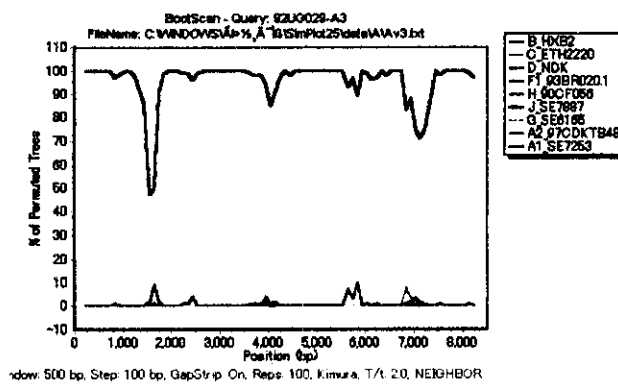


図 2 : 樹立したクローン p92UG031-A1 と p92UG029-A3 の Bootscan 分析

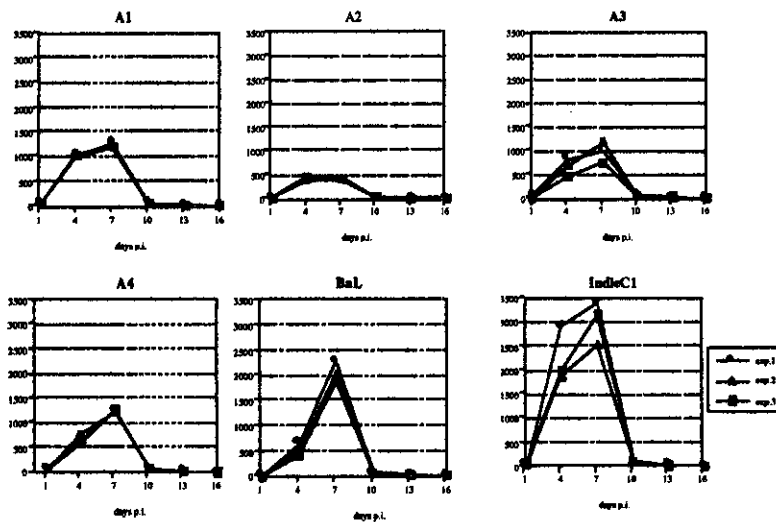


図 3 : HIV-1 subtype A 感染性クローンの PBMC における増殖 A1:p92UG031-A1 A2: p92UG031-A2 A3: p92UG029-A3 A4: p92UG029-A4Ba-L; pBa-L subtype B 感染性クローン indie-C1; pIndie-C1 subtype C 感染性クロー

22. 「HIV 及びその関連ウィルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究」班

分担研究者 横幕能行 国立感染症エイズ研究センター研究官

研究要旨 細胞障害性 T 細胞(CTL)の HIV-1 感染細胞の認識に、epitope 領域や周辺アミノ酸の変異が与える影響を検討した。p17MA 内の HLA-A*0201、*2402 拘束性 epitope 領域内にアミノ酸変異を有する 6 つの臨床検体由来 gag を発現する標的細胞を HIV-1vector を用いて作成し、それぞれの特異的 CTL による認識を調べたところ、ほとんどが認識されなかった。さらに、認識されなかった過半数の変異 epitope は peptide 法で作成した標的細胞では認識されたことから、epitope 領域内のアミノ酸変異が細胞内 MHC-I/peptide 複合体形成過程に影響を与えることにより CTL の認識から逃避し増殖していることが示唆された。

A. 研究目的

細胞障害性 T 細胞(CTL)は HIV-1 感染において、感染細胞の排除に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、HIV-1 感染者では、*in vitro* で強い HIV-1 特異的 CTL 活性が証明されるにもかかわらず、実際には完全なウイルスの排除ができず、ほとんどの未治療の感染者が AIDS を発症する。

HIV-1 が非常に変異に富むウイルスであることから、CTL epitope 領域のアミノ酸変異による CTL の認識からの逃避が重要な一因と考えられてきた。そこで、臨床検体由来 HIV-1 の遺伝子情報から epitope 領域のアミノ酸変異を解析し、その抗原を提示する CTL 標的細胞を作成し、CTL の認識に及ぼす影響が調べられて来た。

標的細胞の作成には、従来、recombinant vaccinia virus を感染させることによって epitope 領域を含む HIV-1 タンパク質を endogenous に発現させる方法や、合成 peptide を細胞外から加え MHC class I に exogenous に結合させる方法 (peptide 法) が行われて来た。前者では発現される vaccinia virus 感染が宿主細胞に与える影響があり実際の HIV-1 感染細胞の状態を必ずしも反映しているとは限らない。peptide 法では、epitope 領域のアミノ酸変異が細胞内の抗原提示機構に与える影響が必ずしも反映されない。

すなわち、従来法で行われて来た epitope 領域のアミノ酸変異の影響の評価は、必ずしも実際の HIV-1 感染細胞における抗原提示の状態を反映したものでない可能性がある。

こうした理由から、実際の HIV-1 感染細胞に近い細胞を用いて epitope 領域のアミノ酸変異が CTL の認識に与える影響を検討することが必要であると考えた。

昨年度、臨床検体由来の様々な gag を発現させることができる HIV-1 vector を作成し、EBV transformed B cell (B-LCL) に VSV pseudotyping の方法を利用して導入し、薬剤で選択することにより、容易かつ迅速に様々な臨床検体由来の gag の全長を安定に発現する標的細胞を作成する系を確立した。今年度は、この系を用いて 6 例の臨床検体由来 gag 全長を発現する標的細胞を作成し、6 クローンの p17MA 中に存在する HLA-A*0201 及び A*2402 拘束性 CTL epitope 領域のアミノ酸変異が CTL の認識に与える影響を調べ、HIV-1 が宿主細胞性免疫から逃れ増殖する機構を検討した。

B. 研究方法

臨床検体由来 gag の cloning

HIV-1 感染者の PBMC から DNA を抽出し nested PCR 法を用いて全 gag を増幅し、5 人の感染者から計 13 クローンを得た(表 1)。その中から、sequence 解析の結果、HLA-A*0201 拘束性 SLYNTVATL と A*2402 拘束性 KYKLVHIVW 領域に最も多様なアミノ酸変異が含まれるように 6 クローンを選択し、今回の研究に用いた。

標的細胞の作成

HXB2 をもとに作成した任意の gag, pol を組み込むことができる HIV-1vector pCTLpac (図 1) に、制限酵素を用いて 6 つの gag クローンを組み込んだ。VSV pseudotyped HIV-1 を調製し、B-LCL に感染させた後、puromycin を用いて遺伝子導入細胞を選択し標的細胞を得た。

これらの標的細胞から抽出した DNA から provirus DNA を増幅、gag 全長の sequence を確認した。また、 1×10^6 個の細胞の 24 時間あたりの p24 産生量を調べたところ、作成した標的細胞間に著明な差異を認めなかった。Western blotting

法によっても、標的細胞間に HIV-1 タンパク質の発現量に差異を認めなかった。

CTL の認識の解析

臨床検体由来の 6 つの全 gag を発現する標的細胞を HLA-A*0201 もしくは A*2402 を有する B-LCL を用いて作成し、それぞれ p17MA の HLA-A*0201 拘束性 SLYNTVATL、A*2402 拘束性 KYLKHIVW または KYRLKHIVW 特異的 CTL を用いて ⁵¹Cr リリース法により CTL assay を行った。代表的な従来法である peptide 法によって作製した標的細胞を用いた場合の結果と比較した。

(倫理面への配慮)

本研究で用いた血液検体は、東京大学医学研究所東大医科研・先端医療研究センター感染症分野岩本愛吉教授がインフォームドコンセントを得て採取したものを御供与いただき使用した。

C. 研究結果

6 つの Gag クローンの 2 つの HLA allele 拘束性 epitope 領域におけるアミノ酸配列

標的細胞作成に用いた 6 gag クローンの p17MA 内の A*0201 および A*2402 拘束性 epitope 領域のアミノ酸配列を HXB2 のアミノ酸配列の該当領域と比較した (図 2)。

A*0201 拘束性 epitope 領域では、HXB2 と同一のアミノ酸配列を有するもの (wild) が 2 例あった。他の 4 クロオンでは図に示すようなアミノ酸変異を認めた。

A*2402 拘束性 epitope 領域については全例にアミノ酸変異を認めた。なかでも、5 クロオンで HXB2 と比較し、3 番目のアミノ酸に Lys (K) から Arg (R) の変異を認めた。

6 つの Gag クローンの A*0201 特異性 epitope SLYNTVATL 特異的 CTL による認識

まず、A*0201 を有する B-LCL (A*0201/-; B*5101/-) を用いて、6 つの臨床検体由来の gag 全長を発現する標的細胞を HIV-1 法によって作成し、A*0201 拘束性 epitope SLYNTVATL 特異的 CTL による認識を調べた。HXB2 と同一のアミノ酸配列を持つクローン 2、5 はともに HXB2 の gag を発現する標的細胞と同程度認識された。クローン 5 を除く 5 クロオンの認識を調べた結果、SLYNTVATL 特異的 CTL によってクローン 1 (6I) はよく認識されたが、クローン 3 (5L)、クローン 4 (3F8V)、クローン 6 (2V) は認識されなかった (図 3a)。しかしながら、アミノ酸配列の情報をもとに変異 epitope 領域の合成 peptide を作成し、peptide 法による標的細胞の

CTL による認識を調べたところ、2V、3F8V は 10 μ M の合成 peptide を用いた場合、wild と同等に認識された (図 3b)。そこで、両方法で認識されなかった 5L を除き peptide titration assay を行い peptide 法による標的細胞の CTL による認識をさらに詳細に解析した。その結果、特に 2V は wild より低い peptide 濃度でも良く認識された (図 3c)。

以上の結果から、HLA-A*0201 拘束性 epitope SLYNTVATL では、HIV-1 法で標的細胞を作成した場合、epitope 領域にアミノ酸変異を認めた 4 クロオンのうち、3 クロオンが CTL に認識されなかった。しかもそのうちの 2 例では、アミノ酸配列情報に基づき変異 epitope を合成し peptide 法で標的細胞を作成した場合は認識された。すなわち、epitope 領域に変異を認めた 4 クロオンのうち 2 クロオンで、HIV-1 法と peptide 法の間で CTL の認識に乖離を認めた。

6 つの Gag クローンの A24 拘束性 KYLKHIVW 特異的 CTL による認識

A*0201 で見られた HIV-1 法と peptide 法との CTL の認識結果の乖離が、ある特異的な HLA allele の特異的 CTL epitope に見られる現象である可能性がある。そこで、A*2402 拘束性 epitope である KYLKHIVW についても同様の実験を行った。

今回対象とした A*2402 拘束性エpiteope の場合、5 例で HXB2 と比較し 3 番目のアミノ酸に Lys (K) から Arg (R) の変異を認めた。そこで、まずその変異 epitope peptide KYRLKHIVW (3R) 及び RYRLKHIVW (1R3R) を合成し、B-LCL (A*2402/-; B46/52) を用い peptide 法でこれらを提示する標的細胞を作成した。KYLKHIVW (wild) 特異的 CTL の認識を調べたところ、これらの変異 epitope は共に認識されなかった (図 4a)。HIV-1 法を用いた場合も同様に認識されなかった (data not shown)。3R peptide は wild と同等に HLA 分子に結合したことから (data not shown)、この原因は TCR が HLA-peptide 複合体を認識できないためと考えられた。そこで、さらに 3R 特異的 CTL を用いて解析を行った。

まず、peptide 法、HIV-1 法の両方法で wild および 3R, 1R3R の epitope を標的細胞に発現させた場合、3R 特異的 CTL は両方法で 3R, 1R3R を認識した。しかしながら wild は認識されなかった (図 4b)。

HIV-1 法で作成した 6 つクローンを発現する標的細胞の 3R 特異的 CTL の認識を調べたところ、クローン 1 (3R7L)、クローン 3 (1Q3R)、クローン 6 (1R3R7L) は、CTL の認識が消失した (図 4c)。しかしながら、これら 3 クロオンの変異

peptide を合成し、peptide titration assay を行ったところ、全て認識され、なかでも 1Q3R は、3R より低い濃度でも効率よく認識された (図 4d)。クローン 5 (1Q) は HIV-1 法、peptide 法の両方法で 3R 特異的 CTL に全く認識されなかった (data not shown)。

HLA-A*2402 拘束性 epitope KYCLKHIVW および KYRLKHIVW では、全例に epitope 領域にアミノ酸変異を認めた。そのうち 3 例は、wild および 3R 特異的 CTL の認識から逃避していた。KYRLKHIVW 特異的 CTL の認識に関しては、A*0201 拘束性 epitope で認められたのと同様に、HIV-1 法と peptide 法との結果の間に乖離を認めた。

D. 考察

本研究において、epitope 領域にアミノ酸変異を有する臨床検体由来 HIV-1 の CTL epitope は、peptide 法で標的細胞を作成した場合は認識されるものの、HIV-1 法で標的細胞に発現させた場合には認識されない場合が稀では無いことを明らかにした (図 5)。

peptide 法と HIV-1 法で CTL の認識に乖離があった場合、peptide 法では HIV-1 法で用いた同じ CTL に認識されたことや peptide titration assay の結果から、変異 epitope の HLA 分子への結合や TCR の認識には問題が無いと考えられた。従って、endogenous に HIV-1 抗原を発現させた場合、epitope 領域内のアミノ酸変異が細胞内の未だ完全には解明されていない抗原提示機構に何らかの影響を与え、細胞表面の HLA 分子上の CTL epitope の提示が障害された結果 CTL の認識から逃避した可能性が高いと考えられた。

これまで、多くの CTL epitope は主に塩基配列が既知のごく限られた clade B の実験室株のアミノ酸配列情報をもとに合成された overlapping peptide を用いて同定されてきた。また、MHC-I の peptide 結合部位の構造が解析された結果、CTL epitope の存在部位の予測が可能となった。しかしながら、いずれの場合も、peptide 法によって標的細胞を作成し CTL の認識を確認することにより、それが CTL epitope か否か調べられて来た。

今回得られた結果から、CTL の epitope の同定、評価のためには、peptide 法のみではなく endogenous に抗原を発現させる必要があることを明らかになった。

さらに重要な点は、今回検討したほとんどの変異 epitope は HIV-1 法では CTL の認識から逃避しているにもかかわらず、peptide 法ではその過半数が逃避していると判定されないことである。したがって、HIV-1 感染者の体内に存在する CTL が実

際に virus の増殖抑制に寄与しているかどうかを正確に評価するためには、endogenous に autologous な HIV-1 抗原を発現させ autologous な CTL によって認識するか否かを評価する必要があると考えられた。

また、今回の検討により、HIV-1 は epitope 領域のごく少数のアミノ酸変異により、感染細胞表面の抗原提示を障害し、CTL の認識から逃避し増殖することができることが明らかになった。

これまで HIV-1 の CTL の認識からの逃避機構としては、主に epitope 領域のアンカー部位のアミノ酸変異により MHC-I との複合体形成が阻害されるか、TCR による認識が障害される機構が考えられて来た。これらの場合、peptide 法によって検出することが可能である。これとは別に MLV においては、1 アミノ酸変異によって epitope 領域内に proteasome 切断部位が生じ、そこで epitope が切断される結果 CTL 認識からの逃避が起こることが報告されている。この変異が生じた場合、この epitope は全く感染細胞上に提示されなくなり、CTL の認識から完全に逃避することができる。今回、両法で乖離をみとめた epitope 領域のアミノ酸変異を有する HIV-1 は、このような機構を含め抗原提示機構を障害し CTL からの逃避している可能性がある。しかも、peptide 法では全く逆の結果を示すことから、単独で評価した場合、誤った epitope の評価につながる危険性が大きい。

さらにこれらのアミノ酸変異は HIV-1 の増殖に影響を与えなかった (data not shown)。すなわち、伝播を繰り返す中で、CTL からの完全に逃避した HIV-1 が蓄積している可能性を示唆する。従って、ワクチンに用いる抗原を選定には、臨床検体をもとに、様々な HLA allele の epitope に関して、今回と同様の検討を行うことが必要であると考えられる。

MHC-I の構造解析は epitope のアミノ酸配列の予測に大きく寄与した。今後、細胞内の抗原提示機構の解析が進み、epitope 領域やその周辺領域のアミノ酸変異から CTL の認識の有無を予測できるようになるかもしれない。そのためには、抗原提示機構に関与する機能タンパク質の機能の解析と特異性を決定することが重要である。臨床検体の解析を通じて、今回明らかになったような変異 epitope の情報を蓄積していくことは、将来、抗原提示機構を分子生物学的に明らかにするために重要な情報になる可能性がある。今後、他の HLA allele および異なる clade の臨床検体由来 HIV-1 でも同様の解析をすすめる、抗原提示機構に影響を与える epitope 領域のアミノ酸変異に関する知見