

潜伏HIV-1の再活性化に関わるアクセサリー遺伝子を標的としたエイズ発症阻止技術の開発

所属 理化学研究所 分子ウイルス学研究ユニット
研究者 間 陽子

分担研究者

(1) 理化学研究所	我妻 昭彦、宮武 秀行
(2) 横浜市立大学 医学部 構造生物学研究室	緒方 一博
(3) 大阪府立大学大学院 農学生命科学研究科	渡来 仁
(4) 国立感染症研究所 免疫部 感染免疫室	横田 恭子
(5) 京都大学 ウイルス研究所 感染病態研究領域	三浦 智行
(6) チッソ株式会社 新事業開発室	森田 裕

要旨

アポトーシス活性を有する HIV-1Vpr 変異体を利用した遺伝子治療用ベクターを構築し、HIV-1 感染細胞を特異的に破壊することに成功した。Vpr の新規核移行機序を明らかにすると同時に、新しい機能としてスプライシング阻害効果を発見した。また、エイズ発症阻止技術の効果を感染個体のレベルで評価するアカゲザルの感染実験系を確立した。

1. 研究目的

多剤併用療法が有効に作用して、血中のウイルス量が検出限界以下になった HIV 感染者において潜伏及び持続感染 HIV-1 を完全に排除できていない事実が指摘されている。そこで、多剤併用療法の効果を補うためにも、主たる潜伏感染細胞である静止期T細胞やマクロファージからのウイルスの再活性化を制御する事による新たなエイズ治療法の開発に取り組むことが本研究の目的である。具体的には、HIV-1Vpr 変異体の強いアポトーシス誘導能によって持続感染細胞を排除し、一方、Vpr の核局在能を競合的に阻害するペプチドをコードする発現ベクターによって HIV-1 の感染を阻止する。さらに、ウイルスの再活性化を目指して、Vpr と Nef の機能発現に関わる細胞内因子の検索とそれらを介して制御されるシグナル伝達の分子機構を解明する。最後に、エイズ治療法開発のためのサルの評価系の確立と有効な遺伝子治療用リポソームベクターの研究開発を目指す。

2. 研究方法

- ① Vpr と SAP145 との相互作用の解析: HIV-1 pNL432 由来の *vpr* 遺伝子及び各種欠失変異体に Flag-tag を連結した発現ベクターを HeLa 細胞に導入した。SAP145、SAP49、U1snRNP70、及び U2AF/65 に対する抗体でそれぞれ免疫沈降後、抗-Flag 抗体で Western Blot を行った。
- ② Vpr による α -globin mRNA 前駆体のスプライシングへの影響: Vpr 発現ベクターを HeLa 細胞に導入、 α -globin mRNA 前駆体の配列特異的プライマーを用いて RT-PCR 法を行った。
- ③ GST-Vpr 蛋白質と SAP145 の発現と精製: GST 融合蛋白発現用ベクター pGEX-5X3 に *vpr* 遺伝子を挿入し、大腸菌株 ER2566 内で発現誘導させた。pIVEX2.3 ベクターに SAP145 遺伝子を挿入し、*in vitro* translation 法で SAP145 を合成した。
- ④ *in vitro* スプライシング法: スプライシング反応の基質 RNA として、 α -globin 2 の pre-mRNA exon1-intron1-exon2 の配列を用いた。この RNA は α -globin 2 のゲノム配列を持つプラスミドから、アイソトープラベルし *in vitro* 合成した。精製した pre-mRNA を HeLa-S3 の Nuclear extract (NE) 中で、エネルギーとして ATP を用いてスプライシング反応を行った。
- ⑤ C81 発現ベクター封入リポソームの作成: pHIV-LTRbsr の LTR 下流に、HIV-1Vpr C81 変異体を Flag-tag 付きで挿入し、TMAG 陽性荷電でベクターを封入した。
- ⑥ 抗-gp120 モノクローナル抗体 (mAb) 結合リポソームの調製: TMAG、DOPE、DLFC の 3 つの脂質と DPT-DPPE を 1:2:2:0.1 の比率で混合して脂質膜を作製した。この脂質膜に PBS と DNA を入れ攪拌後、ピリジルジチオ基結合 DNA 封入 TMAG リポソームとした。抗-gp120mAb は、SPDP でピリ

ジルジチオ基を導入し、DTT で還元し、チオール化を行った。

- ⑦ 細胞と特異的に融合できるリポソームの検討 : DPPC:DOPE、モル比 1:1 からなる脂質組成にサクシニル化ポリグリシドール (SucPG) を重量比で 30% 含むリポソーム (SucPG-リポソーム) ならびに TMAG:DLPC:DOPE、モル比 1:2:2 からなる脂質組成に SuCPG を重量比で 30% 含むリポソーム (SucPG-TMAG リポソーム) を作製し、細胞膜との融合能について検討した。細胞膜との融合能は、SucPG-リポソームあるいは SucPG-TMAG リポソームにカルセインを封入し、MP3 細胞 (ウシマクロファージ細胞株)、J774.1 細胞 (マウスマクロファージ細胞株) ならびに DH82 細胞 (イヌマクロファージ細胞株) を標的とし、カルセインの細胞内導入により調べた。
- ⑧ マンノース被覆リポソームの作製 : 還元アミノ化反応により、マンノースを DPPE に導入し、人工糖脂質 (Man-DPPE) の合成を行った。SucPG-リポソームの表面にマンノース 5 個結合した Man-DPPE を組み込み、マンノース被覆リポソームを作製した (SucPG-Man リポソーム)。また、コレステロール (Chol) -マンナンを用いて同様にマンノース被覆リポソームを作製した (SucPG-Chol-Man リポソーム)。リポソーム表面のマンノース被覆の確認は、Con A による凝集試験により行った。
- ⑨ マンノース被覆リポソームによる細胞内導入 : マンノース被覆リポソームの細胞内導入能について検討した。細胞内導入能は、Chol-マンナンを用いて作製したマンノース被覆リポソームにカルセインを封入し、MP3 細胞、J774.1 細胞ならびに DH82 細胞を標的とし、カルセインの細胞内導入により調べた。
- ⑩ HIV-1 感染細胞への発現ベクターの導入 : HIV-1NL432 株を感染させた CEM 細胞を継代培養後、 2×10^6 個に対して陽性荷電リポソームに封入した plasmid 0.8 μ g を混和し、一昼夜培養した。
- ⑪ C81 によるアポトーシス誘導機構の解明 : 各種発現ベクターを導入した HeLa 細胞由来の抽出液を調製し、Caspase-3、-8 及び-9 の酵素活性を測定した。Mitocapture 試薬を用いてミトコンドリア膜電位の変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。cytochrome C の細胞質への流出はミトコンドリアと細胞質画分を分画後、抗-cytochrom C 抗体により Western Blot を行い測定した。
- ⑫ nuclear import法 : 核移行解析はDigitonin処理HeLa細胞を用いたnuclear import法で行った。組換え型importin (Imp) をN末端側にGSTを持つ融合蛋白として大腸菌で発現させ、proteaseにてGSTを切断除去した。
- ⑬ Imp α の精製と pull down法 : N末端側にGSTを持つ組換え型マウス Imp α を大腸菌株BL21 (DE3) 内で発現させ、GSH-Sepharose beadsにて回収した。野生型及び各種変異型 Vpr 蛋白として、*in vitro* translationで合成したものを、或いはそれらの発現ベクターを導入したHeLa細胞由来の抽出液を調製して、pull down法を行った。
- ⑭ マクロファージ指向性感染性DNAクローンpNF462のvpr変位体の構築 : pNF462のNde IとSal Iの断片をpBluescript II SK⁺にsubcloningし、PCR direct mutagenesis 法によってvprのスタートコドンATGをGTGに変換した。この遺伝子を含むNde IとSal Iの断片をpNF462のApa IとSal Iに入れ替え、vpr欠損pNF462を作製した。各種vpr変異体を有するpNF462も作製した。これらをCOS7細胞にリポフェクション法で導入、ウイルス量をELISA法で測定し、感染性をMAGIC-5法で確認した。
- ⑮ マクロファージに対するウイルス感染実験 : 健康なドナーから採取した末梢血リンパ球を遠心分離後、さらにカラムに通して CD14 分子陽性の未分化マクロファージを単離し、GM-CSF で刺激して 2 週間培養後、分化したマクロファージを準備した。これらに各種 pNF462 を COS7 細胞に導入して得たウイルスを感染させた。培養上清中の p24 抗原量の変化を抗-p24 抗体を用いた ELISA 法にて測定した。
- ⑯ Nef 発現ベクターの構築 : N1432 由来 Nef の下流に EGFP を IRES 組み込んで CAGG プロモーターの下流につないだ CA-Nef と CA control アデノウイルスを作成した。また、Tet-off システムの transactivator プラスミドを EF promoter に組換えて発現させたアデノウイルス (AxEF-TA) と T2-Nef 発現ベクターに EGFP を IRES をはさんで発現させたアデノウイルス (AxT2-nef-IRES-EGFP) を作成した。
- ⑰ 遺伝子発現解析 : マクロファージにアデノウイルスベクターCA-control, CA-Nef を感染させ、免疫 DNA アレイメンブラン (東洋紡) を用いて約 800 個の遺伝子の発現プロファイル解析した。
- ⑱ FACS 解析 : 各標識抗体は Beckman Coulter 社より購入し、細胞表面の CD4 および MHC class I 抗原を染色した。一部の実験では、2% formalin で固定した後 0.2% Saponin/PBS/2%FCS で処理して膜を permeabilize し、Alexa647 標識モノクローナル抗 Nef 抗体 (F3) で細胞内 Nef の発現を同時

に検出した。アポトーシスの解析は FITC 標識アネキシン V を用いた。

- ⑨ 各種遺伝子改変 SHIV の作製：各種 SHIV 感染性分子クローンを作製し、アカゲザルに接種実験を行い、血漿中ウイルス RNA 量、末梢血リンパ球からのウイルス分離、末梢血リンパ球ポピュレーションの解析、抗体反応及び免疫系組織における病理組織学的検索を行った。また、ヒトエイズ治療に用いられている抗 HIV 薬を SHIV 感染サルに投与し、同様の感染病態解析を行う。

3. 研究成果

1) HIV 感染の治療及び予防に有効な Vpr を用いた遺伝子治療用リポソームベクターの開発：

我々の第一の目標は著しいアポトーシス活性を有する Vpr の C 末端欠失変異体を用いて、HIV-1 感染細胞を特異的に破壊するリポソーム封入ベクターを構築することである。そこで最初に我々は、HIV 感染の治療及び予防に有効な遺伝子治療用リポソームベクターの研究開発を行った。カルセインを封入した SucPG-リポソームは、マクロファージ細胞株に対して高い融合能を示し、カルセインを細胞内に導入することができた。特に SuCPG を含む TMAG リポソームは、マクロファージ細胞内へカルセインを効率よく導入できた。さらに、還元アミノ化反応により作製したマンノースを 5 個結合した Man-DPPE ならびに Chol-マンナンを用いてマンノース被覆リポソームを作製した。マンノースによる被覆を確認するために、Con A を用いた凝集試験を行った。その結果、マンノースを被覆していないリポソーム (SucPG-リポソーム) は Con A により凝集されなかったが、マンノース被覆リポソーム (SucPG-Man リポソームならびに SucPG-Chol-Man リポソーム) はいずれも Con A により凝集された。このことから、リポソームがマンノースにより被覆されていることが確認された。マンノース被覆リポソームによるカルセインのマクロファージ細胞内への導入は、SucPG-Man リポソームならびに SucPG-Chol-Man リポソームのいずれのマンノース被覆リポソームでも高い導入効率を示した。

次に、HIV-1 Tat の存在下で発現が誘導される遺伝子治療用ベクターを作成するために、HIV-LTR の下流に C81 変異体を連結した。これを Tat 発現ベクター CV-1 と共に HeLa 細胞に導入した結果、Tat 特異的な発現誘導が観察された。次に、このベクターを陽性荷電リポソームに封入後、HIV-1 感染 CEM 細胞に導入し、Caspase-3 活性を測定した (図 1)。Vpr、C81I74P 及びコントロールベクターでは、感染及び非感染細胞のいずれにおいてもほとんど Caspase-3 活性が認められなかった。一方、C81 発現ベクターでは感染細胞においてのみ著しく高い Caspase-3 活性が認められた。さらに、感染細胞に対するターゲティングを高めるために、抗-gp120 mAb 結合リポソームを作製して、HIV-1 感染細胞に導入した。Caspase-3 の活性は C81 発現ベクター導入細胞でのみ顕著に検出され、C81 ベクターは HIV-1 感染細胞を特異的に破壊できる可能性が示された。

さらに、C81 によるアポトーシス誘導機序を調べた。HeLa 細胞に C81 発現ベクターを導入し、36 時間後に細胞抽出液を調製し、Caspase-3、-8 及び-9 の活性を測定した。C81 に強いアポトーシス誘導活性が観察され、特に Caspase-3 と-9 の活性が上昇した。一方、Caspase-8 の活性は変化がなかった。次に、C81 がミトコンドリアの膜電位に変化を与える可能性を考え、Mitocapture 試薬により、ミトコンドリア膜電位の変化を観察したところ、C81 導入細胞では赤い蛍光が消失し、膜電位が低下していた。さらに、ミトコンドリアと細胞質画分を分画後、抗-cytochrome C 抗体により Western Blot を行ったところ、C81 導入細胞では cytochrome C が細胞質に流出していた。以上のように C81 によるアポトーシス誘導はミトコンドリアを経由する pathway を通じて発揮されることが示された。

2) PIC の核移行を標的とした抗 HIV 薬の開発：

Vpr は preintegration complex (PIC) に結合し、それを核に移行させることにより、マクロファージ等の非分裂細胞への HIV-1 の感染を可能にする。これまで我々は、Vpr が Imp α のみを介して核移行が促進される新規核移行能を有する蛋白質であることを明らかにした。そこで、Vpr と Imp α による核移行機序を解明するために、Imp α の機能ドメインを欠損した 6 種類の変異体を精製し、それらを用いた *in vitro* nuclear import 法と pull down 法を行った (図 2)。Vpr の核移行には Imp α の CAS 結合ドメインが、Vpr との結合には Imp β binding (IBB) ドメインが関与することが明らかとなった。更に、Imp α と結合する Vpr 側のドメイン解析を Vpr 発現細胞抽出液を用いた pull down 法で解析した (図 2D)。上述の解析で Imp α と直接結合を示さなかった α H2 が Imp α と間接的な結合を示した。以上の結果から、Vpr の核移行には CAS 結合ドメインが必要であり、この過程は Vpr とある種の細胞内因子を介した Imp α との間接結合を介して行われる可能性が示唆された。

Imp α には複数の isoform が存在するが、それらは 3 つのサブファミリーを形成しており、それぞ

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

HIV-1 のマクロファージ感染における Vpr の核移行の意義を調べるために、G2 期 arrest、アポトーシス、核移行能が著しく減弱した Vpr 変異体を感染性分子クローン pNL432 の *vpr* 遺伝子の N 末に最も近い α -helix ドメイン、leucine-zipper 様ドメイン及び C 末の arginine-rich ドメインをコードする領域に変異を導入して得た。それらの *vpr* 遺伝子を有するマクロファージ指向性感染性 DNA クローン pNF462 を構築し、COS7 細胞に導入して、ウイルスを産生させた。次に、健康なドナーから準備した GM-CSF で分化させたマクロファージに感染させ、ウイルス量の変化を感染後 18 日まで測定した。野生型ウイルス及び G2 期 arrest 能、アポトーシス能の減弱した Vpr 蛋白を有する変異ウイルスを感染させた場合には、顕著なウイルス産生が確認されたが一方、Vpr 欠失ウイルス及び核局在を消失した Vpr 蛋白を有する変異ウイルスではウイルスが殆ど産生されなかった。以上の結果から、Vpr の核局在能がマクロファージにおける HIV-1 の感染に対して重要であることが明らかとなった。

3) Vpr と SAP145 との相互作用の解析と Vpr の新規スプライシング阻害機能の発見:

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

最初に、細胞内での Vpr と SAP145 の結合作用を解析した。N 末端-Flag 融合 Vpr を HeLa 細胞で発現させ、抗-SAP145 抗体で免疫沈降し、抗-Flag 抗体で Western Blot を行うと、共沈した Vpr のバンドが見られ、細胞内での相互作用が確認できた (図 4A)。このことから Vpr と SAP145 の相互作用が酵母を用いた場合と同様にヒト細胞でも確認できた。次に、大腸菌で発現させた N 末端 GST 融合 Vpr と *in vitro* translation で合成した SAP145 を用いた GST pull down 法を行った。その結果、SAP145 濃度を一定とし、GST-Vpr 量を増加させるとその量依存的に SAP145 のバンドが増加したことから、*in vitro* での相互作用も確認できた (図 4B)。さらに、Vpr とスプライソソーム中に存在するスプライシング因子との相互作用を 3つの Splicing factor に対する抗体を用いた免疫沈降法により解析した。Vpr はスプライソソーム中の U1snRNP70 及び U2AF/65 とともに結合することが明らかとなった (図 5)。

以上の結果から、スプライソソーム中に存在するこれらの分子と Vpr との相互作用によりスプライシングに何らかの影響が及ぼされることが予想された。そこで、 α -globin mRNA 前駆体を材料としてスプライシングにおける Vpr の効果を調べた。最初に、 α -globin 遺伝子を pME18neo 強制発現ベクターに組み込み、Vpr と共に HeLa 細胞及び Jurkat 細胞に導入し、 α -globin のスプライシングの状況を RT-PCR 法で検出した (図 6)。両細胞で共に、Vpr との共導入により intron 1 だけを持つ pre-mRNA の蓄積が検出された。次に、Vpr 発現ベクターを導入後に内在性の α -globin のスプライシングについても RT-PCR 法で解析した (図 7)。同様に、 α -globin mRNA 前駆体からイントロン 2 のみがスプライシングにより除去されたものが大量に検出された。一方、コントロールベクター導入細胞ではイントロンを含むバンドは検出されなかった。このように RT-PCR 法の結果より、Vpr は α -globin2 のスプライシングを阻害することが示された。そこで、この阻害がスプライシング反応そのものを標的としているか否かを同定するために *in vitro* でのスプライシングアッセイを試みた。スプライシング反応の基質 RNA として、 α -globin2 の pre-mRNA exon1-intron1-exon2 の配列を用いた。図 8 に示すように、精製した pre-mRNA を HeLa-S3 の Nuclear extract (NE) 中で、エネルギーとして ATP を用いてスプライシング反応を行なうと、スプライシング反応産物として intron1 が除去された mRNA のバンドが認められた。この反応系に Flag-Vpr を発現させた HeLa 由来の NE を加えると、コントロールベクターを導入した NE に比べスプライシング活性が約 12%減少した。一方、Mock NE を加えても阻害はほとんど観察されなかった。さらに、Flag-Vpr を発現させた HeLa 由来の NE から、SAP145 を除去

すると阻害活性が著しく減少した。以上の結果から、Vpr によるスプライシング反応阻害は SAP145 やその他のスプライシング因子を介して発揮されている可能性が考えられた (図 9)。

続いて、Vpr と SAP145 とが結合した状態での構造解析を目指して、Vpr を GST-Vpr 融合蛋白質として発現させ、GSH-Sepharose beads に吸着させ精製することに成功した。次に、SAP145 の大量発現を行なうために、pIVEX2.3 ベクターに SAP145 遺伝子を挿入、*in vitro* translation 法で SAP145 を合成させ、抗-SAP145 抗体を用いて Western Blot を行った。GST-SAP145 蛋白質の予想位置にバンドが検出され、合成が成功していることを確認できた。現在、精製 Vpr の大量精製の準備を進めている。

4) HIV 潜伏感染細胞におけるウイルスの再活性化に伴う Nef の機能の解析とその制御:

CA-Nef アデノウイルスを感染させた単球由来マクロファージにおける細胞内 Nef の発現効率と細胞表面抗原の発現を FACS で解析した。その結果 MOI 500 でほとんどの細胞が Nef を発現し、CD4 及び MHC class I 分子の downmodulation がおこっていることを確認した。そこで CA control あるいは CA-Nef アデノウイルス感染マクロファージ (実験 1) あるいは非感染と CA-Nef アデノウイルス感染マクロファージ (実験 2) に LPS 刺激を加えて培養し、2 日後の細胞から RNA を抽出した。数人の健常人のマクロファージを同一条件で培養して抽出した RNA をプールして mRNA に純化して標識 cDNA を合成した後、DNA アレイメンブランを用いてそれぞれの細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。これらの遺伝子のうち、Nef の発現に伴ってその発現が変化する主な遺伝子群を表 1 にまとめた。2 回の実験の結果から判断すると、アポトーシス関連の遺伝子である Bax や BID の発現が Nef の発現に対応して増加しており、CD88、Ref-1、MMP9 やケモカインの一部はむしろ減少していた。しかしながら、発現量の比は最大でも 2~3 倍の増加か半分~1/3 程度の減少にすぎず、この条件下のマクロファージでは Nef による際だった影響はないことが示唆された。

樹状細胞は生体内での最も強力な抗原提示細胞であることから、Nef 発現による T 細胞の活性化機能を中心に解析した。T 細胞やマクロファージ同様、CD4 や MHC class I 分子の表面抗原の発現低下が認められるものの、CD4 陽性 T 細胞に対する抗原提示細胞機能の障害は認められなかった。また、HIV の envelope 蛋白と結合してウイルスの感染伝播に重要な役割を果たすと考えられている DC-SIGN も、Nef 発現による発現増加を認めなかった。単球由来樹状細胞は最終分化した非分裂細胞であり、LPS 等の刺激で成熟化させると細胞の生存率が低下することが知られている。そこで未熟な樹状細胞に Nef 発現アデノウイルスを感染させ、LPS を加えて成熟化させた樹状細胞と未熟なままの樹状細胞にドキシサイクリンで Nef の発現を抑制して培養維持したところ、特に未熟な樹状細胞において Nef 発現群 (Adx Nef) で細胞数が減少する傾向が強かった。この未熟樹状細胞の生存率の低下が Nef による直接的なアポトーシス誘導によるものであるのかどうかを更に検討した結果、同じアデノウイルス感染細胞でも、Nef 発現細胞群のみアポトーシス細胞の割合が顕著に増加していることが明らかとなった。

5) エイズ発症阻止技術のサルにおける評価系の確立と vpr を用いた遺伝子治療用リポソームベクターの効果検定:

強毒 SHIV 株ゲノムのコンセンサス配列を持つ分子クローンウイルスを作製し、アカゲザルに接種したところ、親株と同様の強病原性が再現された。両者の塩基配列を比較したところ、強毒と弱毒クローン間での塩基配列の違いは、全長約 1 万塩基中 17 カ所であり、このうちオープンリーディングフレームのアミノ酸変異を伴うものは、僅かに 6 カ所 (*gag*-P6/*pol*-leader、*pol*-RT、*pol*-IN、*env*-gp41 に 3 カ所) のみであった。変異部位を交換した種々の分子クローンを作製し、*in vitro* での増殖能を比較解析したところ、感染初期におけるウイルス抗原量当たりの感染価を数十倍変化させるような変異が *env*-gp41 領域の 2 カ所に特定された。また、これとは別に感染後期においてウイルス産生量を数倍程度増強させる変異が *gag* から *pol* 領域にかけて存在することが示唆された。

持続的に 10^5 コピー/ml 程度の安定した血漿ウイルス量を示す SHIV 感染アカゲザルに、現在ヒトのエイズ治療に使用されている逆転写酵素阻害剤 (コンビビル) とプロテアーゼ阻害剤 (カレトラ) を SHIV に持続感染しているサルに一日 2 回 4 週間連続経口投与した。投与開始後一週以内に血漿中ウイルス量が減少し、3 週間後には検出限界以下になった。また、投与終了 2 週間後には、ウイルス量が投与以前のレベルに戻った (図 10)。

4. 考察

著しいアポトーシス活性を有する Vpr の C 末端欠失変異体を HIV-1 LTR の下流に連結させた C81 発現ベクターは HIV-1 Tat の発現特異的に発現が誘導される事を確認した。次に、免疫原性が無く、生体に対し安全性の高いリポソームを遺伝子導入ベクターとして選択し、標的細胞へのターゲティングを高めるために、抗-gp120 mAb をリポソームに結合させた。この遺伝子治療用ベクターは *in vitro* において HIV-1 感染細胞を特異的にアポトーシスさせることを証明した。以上の結果は、C81 変異体を用いて HIV-1 持続感染細胞を特異的に除去できる可能性を示唆するものである。今後、これらのベクターの有効性を SHIV-サルモデル系を用いて解析する予定である。

また、細胞に対し毒性のない TMAG:DLPC:DOPE のモル比 1:2:2 からなるリポソーム (TMAG リポソーム) をベースにした遺伝子導入ベクターは生体に対し安全性の高いベクターであることを明らかにした。さらに、SucPG-リポソームの細胞との高い融合能は、細胞内への遺伝子導入において有用であることも示された。特に、SucPG-TMAG リポソームはマクロファージ細胞株に対して高い融合能を示しており、マクロファージへの効率の良い遺伝子導入法になると予測された。また、本研究においてマンノースで被覆されたリポソームにより、カルセインがマクロファージ細胞へ効率良く導入できたことは、マンノース被覆リポソームによるマクロファージへの特異的遺伝子導入が可能であることを示唆しており、今後、本研究を進める上で極めて意義深い結果であると言える。

本研究において、1) Vpr は α H2 を介して FG リピートを有する nucleoporin と、さらに α H1 を介して Imp α と結合すること、2) α H2 は核膜結合に、 α H1 は核内への移行に寄与すること、3) 核膜に結合した Vpr は、Imp α 依存的に核膜を通過すること、4) Vpr の核膜通過には Imp α との結合と FG repeat を有する nucleoporin との結合のいずれもが必須であることを明らかにした。このような Vpr の新規核移行は Vpr の核移行の制御を通じて PIC 核移行阻害剤開発が可能であることを示唆している。

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

本研究において、我々は Vpr の新しい機能としてスプライシングの阻害効果を発見した。即ち Vpr の過剰発現によって α -globin mRNA 前駆体からのイントロン 1 のスプライシングが阻害されることを見いだした。今後は Vpr によるスプライシング阻害における RNA の配列特異性の有無、スプライシング阻害作用と既知の Vpr の機能との相関および 30 種類以上あるとされる HIV-1 mRNA のスプライスパターンの形成における Vpr の意義について解析していく予定である。

Nef がエイズの病態に何らかの形で貢献していることは以前から指摘されているにもかかわらず、その本質的な役割については不明である。Nef の発現は感染初期あるいは再活性化の初期段階に最も強いことから、LPS 刺激したマクロファージや樹状細胞での Nef 発現の効果を中心に解析を進めた結果、マクロファージでも樹状細胞でも、Nef がこれらの細胞のアポトーシスに関与する可能性が大きいことが示唆された。特に、HIV 感染者の末梢血に存在する樹状細胞数の減少はいくつか報告されており、抗原提示細胞の減少あるいは機能低下は、慢性 HIV 感染者で徐々に進行する T 細胞活性化障害と強い因果関係があると考えられる。ウイルス再活性化にともなう Nef の発現はこの様な形で病態形成に関与しているのかもしれない。

今回、感染個体レベルで異なる病態を示した SHIV の遺伝的なバックグラウンドを明らかにし、遺伝子上の僅かな変異が培養細胞レベルにおけるウイルスの感染価や産生能に、それぞれ独立に影響を及ぼすことが示された。現在、それぞれの変異が感染個体レベルでの病原性にどのように影響を及ぼすかアカゲザル感染実験により検討中であり、SHIV の病原性の分子基盤解明に大きく寄与するものと期待される。また、ヒトでエイズ治療薬として実際に使用されている抗 HIV 薬が SHIV-アカゲザルの系でも血漿ウイルス量を減少させることが明らかとなったことから、本研究課題において新規に開発されたエイズ発症阻止技術の効果を感染個体のレベルで評価するための判定基準が確立できたと考えられる。

5. まとめ

- 1) HIV-1 LTRの下流にアポトーシス活性を有する C81 変異体を陽性荷電リポソームに封入後、HIV-1 感染細胞に導入したところ、感染細胞を特異的に破壊した。C81 発現ベクターを抗-gp120 mAb 結合リポソームで封入した結果、HIV-1 感染細胞へのターゲッティングが高まった。C81 はミトコンドリアを経由する pathway を通じてアポトーシスを誘導した。
- 2) SuCPG-リポソームは細胞と特異的に融合し、リポソーム封入物を細胞内へ導入できることが示された。特に、SuCPG-TMAG リポソームはマクロファージ細胞株に対して高い融合能を示した。被覆リポソーム (SucPG-Man リポソームならびに SucPG-Chol-Man リポソームマンノース) は効率よく封入物をマクロファージ細胞へ導入できた。
- 3) Vpr 結合性因子としてこれまでに報告のなかった SAP145 を見出した。
- 4) Vpr の新しい機能としてスプライシングの阻害効果を発見した。
- 5) Vpr が核膜孔蛋白質と直接結合した後に、Imp α を介して核移行すること、その過程は N 末端側に存在する α -helix ドメインと Imp α の CAS 結合ドメインとの間接結合を介して行われることを示した。また、複数ある Imp α の isoform の内、M-CSF で分化させたマクロファージにおいて高レベルな発現が認められた Rchl が、Vpr の核移行を最も促進することを見出した。
- 6) マクロファージと樹状細胞において Nef の発現は細胞表面の CD4 や MHC class I 分子の downmodulation の他に、これらの細胞の維持に関わる機能分子に影響を及ぼしている可能性が示唆された。これらの細胞は免疫反応の開始に重要な役割を果たす抗原提示細胞であり、Nef がウイルスの再活性化の際に抗原提示細胞の減少を誘導しているとするれば、エイズ病態形成を促進する要因である可能性は高いと考えられた。
- 7) SHIV の病原性の分子基盤を解明する為に有用な種々の SHIV 分子クローンが得られた。また、ヒトで使用されている抗 HIV 薬の効果が SHIV-アカゲザルの系でも確認され、エイズ発症阻止技術のサル感染モデルにおける効果判定基準が確立できた。

6. 研究発表

1. Tajima, S. and Aida, Y. Mutant Tax protein from bovine leukemia virus with ability to activate the expression of c-fos. *J. Virol.*, **76**, 2557-2562, 2002
2. Takeshima, S., Nakai, Y., Ohta, M. and Aida, Y. Characterization of *DRB3* alleles in the MHC of Japanese Shorthorn cattle by polymerase chain reaction-sequence-based typing. *J. Dairy Sci.*, **85**, 1630-1632, 2002
3. Tahirov, T. H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S. and Ogata, K. Mechanism of c-Myb-C/EBP β cooperation from separated sites on a promoter. *Cell*, **108**, 57-70, 2002
4. Tsunetsugu-Yokota, Y., Tamura, H., Tachibana, M., Ogata, K., Honda, M. and Takemori, T. Selective expansion of perforin-positive CD8⁺ T cells by immature dendritic cells infected with *Bacillus Calmette-Guerin* mycobacteria. *J. Leu. Biol.*, **72**, 115-124, 2002
5. Tahirov, T.H., Sato, K., Inoue-Bungo, T., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Fujikawa, A., Shiina, M., Takata, S., Kimura, K., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S., Ogata, K. Structural aspects of gene expression by AML1/CBF β , c-Myb, AMV v-Myb, C/EBP β and Ets-1. *Acta Cryst.*, **A58** (Supplement), C20, 2002.
6. Ogata, K., Sato, K., Tahirov, T.H. Eukaryotic transcriptional regulatory complexes: cooperativity from near and afar. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **13**, 40-48, 2003
7. Harada, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Koyanagi, Y., Sata, T., Kurata, T. and Kojima, A. Role of nucleotide sequences in the V3 region in efficient replication of CCR5-utilizing human Immunodeficiency virus type 1 in macrophages. *Virology*, **299**, 192-203, 2002
8. Takemura, T., Yamashita, M., Shimada, K. M., Ohkura, S., Shotake, T., Ikeda, M., Miura, T. and Hayami, M. High prevalence of simian T-lymphotropic virus type L in wild ethiopian baboons. *J. Virol.*, **76**, 1642-1648, 2002
9. Kozyrev, I., Miura, T., Takemura, T., Kuwata, T., Ui, M., Ibuki, K., Iida, T. and Hayami,

- M. Co-expression of interleukin 5 enhances replication of simian/human immunodeficiency chimeric virus in vivo. *J. Gen. Virol.*, 83, 1183-1188, 2002
10. Kwofie, T. B., Miura, T., Ibuki, K., Enose, Y., Suzuki, H., Ui, M., Kuwata, T. and Hayami, M. Characterization of simian and human immunodeficiency chimeric viruses re-isolated from vaccinated macaque monkeys after challenge infection. *Arch. Virol.*, 147, 1091-1104, 2002
 11. Kuwata, T., Takemura, T., Takehisa, J., Miura, T. and Hayami, M. Infection of macaques with chimeric simian and human immunodeficiency viruses containing Env from subtype F. *Arch. Virol.*, 147, 1121-1132, 2002
 12. Enose, Y., Ui, M., Miyake, A., Suzuki, H., Uesaka, H., Kuwata, T., Kunisawa, J., Kiyono, H., Takahashi, H., Miura, T. and Hayami, M. Protection by intranasal immunization of a nef-deleted, nonpathogenic SHIV against intravaginal challenge with a heterologous pathogenic SHIV. *Virology*, 298, 306-316, 2002
 13. Haga, T., Shimizu, Y., Okoba, M., Kumabe, S., Goto, Y., Shinjo, T., Ichimura, H., Kuwata, T., Hayami, M. and Miura, T. Construction and in vitro properties of chimeric simian and human immunodeficiency virus with the human TNF-alpha gene. *Microbiol. Immunol.*, 46, 849-855, 2003
 14. Irie, T., Watarai, S. and Kodama, H. Humoral immune response of carp (*Cyprinus carpio*) induced by oral immunization with liposome-entrapped antigen. *Develop. Comp. Immunol.*, 27, 413-421, 2003
 15. Tana, Watarai, S., Isogai, E. and Oguma, K. Induction of intestinal IgA and IgG antibodies preventing adhesion of verotoxin-producing *Escherichia coli* to Caco-2 cells by oral immunization with liposomes. *Lett. Appl. Microbiol.*, 36, 135-139, 2003
 16. Tajima, S., Takahashi, M., Takeshima, S., Konnai, S., Watarai, S., Yin, S. A., Tanaka, Y., Onuma, M., Okada, K. and Aida, Y. A mutant form of the Tax protein of bovine leukemia virus (BLV) with enhanced transactivation activity, increases expression and propagation of BLV in vitro but not in vivo. *J. Virol.*, 77, 1894-1903, 2003
 17. Tajima, S., Tsukamoto, M. and Aida, Y. Latency of viral expression in vivo is not related to CpG methylation in the U3 region and part of the R region of the long terminal repeat of bovine leukemia virus. *J. Virol.*, 77, 4423-4430, 2003
 18. Konnai, S., Takeshima, S., Tajima, S., Yin, S. A., Okada, K., Onuma, M. and Aida, Y. The influence of ovine MHC class II DRB1 alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiol. Immunol.*, 47, 223-232, 2003
 19. Konnai, S., Nagaoka, Y., Takeshima, S., Onuma, M. and Aida, Y. Sequence and diversity of 17 new *Ovar-DRB1* alleles from three breeds of sheep. *Eur. J. Immunogenet.*, in press.
 20. Yoshizawa, I., Mizuochi, T., Ogata, A., Murakami, M., Yagaita, H., Takahashi, Y., Takemori, T., and Tsunetsugu-Yokota, Y. Studies on the generation and maintenance of mucosal CTL against human immunodeficiency virus type-1 Gag in mice, *AIDS Res. Hum. Retro.*, 2003, in press.
 21. Ohkura, S., Miura, T., Yamashita, M., Ibuki, K., Takemura, T. and Hayami, M. Phylogenetic analysis of HTLV-1 and STLV—The past movement of HTLV-1-carriers and the origin of PTLV—. *Gann monograph*, in press.
 22. Shimada, T., Suzuki, H., Motohara, M., Kuwata, T., Ibuki, K., Ui, M., Iida, T., Fukumoto, M., Miura, T. and Hayami, M. Comparative histopathological studies in the early stages of acute pathogenic and nonpathogenic SHIV-infected lymphoid organs. *Virology*, in press.
 23. Haga, T., Okoba, M., Yamazaki, N., Kumabe, S., Shimizu, Y., Goto, Y., Kuwata, T., Kozyrev, I., Hayami, M. and Miura, T. Development of vpr vector from chimeric simian and human immunodeficiency virus. *J. Vet. Med. Sci.*, in press.
 24. Morita, H., Ushiyama, M., Aoyama, S., and Iwasaki, M. Sensitivity and specificity of

- the Sanita-kun Aerobic Count: Internal validation and independent laboratory study. J. AOAC International, 86, 2003, submitted.
25. Kamata, M., and Aida, Y. Retardation of cell growth by human immunodeficiency virus type 1 Vpr-mediated bystander effect., submitted.
 26. Kamata, M., Miyamoto, M., Yoneda, Y., and Aida, Y. Importin α promotes through nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type-1 Vpr as independent manner of importin β , submitted.
 27. Azuma, A. and Aida, Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle arrest at the G1 phase and apoptosis via disruption of mitochondrial function in rodent cells., submitted.
 28. Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B., Iwamoto, A. Yeast-derived HIV type-1 p55gag virus-like particles activated DCs and induce perforin expression in Gag-specific CD8+ T cells by cross-presentation of DCs., submitted.
 29. Takeda, K., Miyatake, H., Yokota, N., Matsuyama, S., Tokuda, H., Miki, K. A practical phasing procedure of MAD method without the aid of XAFS measurements: Successful solution in the structure determination of the outer membrane lipoprotein carrier LolA. Acta Crystallographica Section D, submitted.
 30. Wakamoto, H., Sakoda, Y., Tamura, T., Fukusho, A., and Morita, H. Development of indirect ELISA kit for the detection of antibodies against classical swine fever virus. J. Vet. Med. Sci., in preparation.
 31. 緒方一博。構造解析のための試料調製(総論) -タンパク質-DNA 複合体を中心として-。遺伝子医学、6、86-95 (2002)。
 32. 緒方一博。分子構造から見た Runx タンパク質による DNA 認識とその制御。細胞工学、21、1216-1219 (2002)。
 33. 緒方一博。プロモーターDNA 上での転写制御因子会合体の形成と転写調節の分子機構。日本結晶学会誌、45、19-25 (2003)。
 34. 三浦智行。成人T細胞白血病ウイルスの系統分析と人類の移動。Science of Humanity, in press.

7. 知的所有権の取得状況

「カスパーゼ9活性化剤」、平成14年8月2日出願、発明者 間陽子

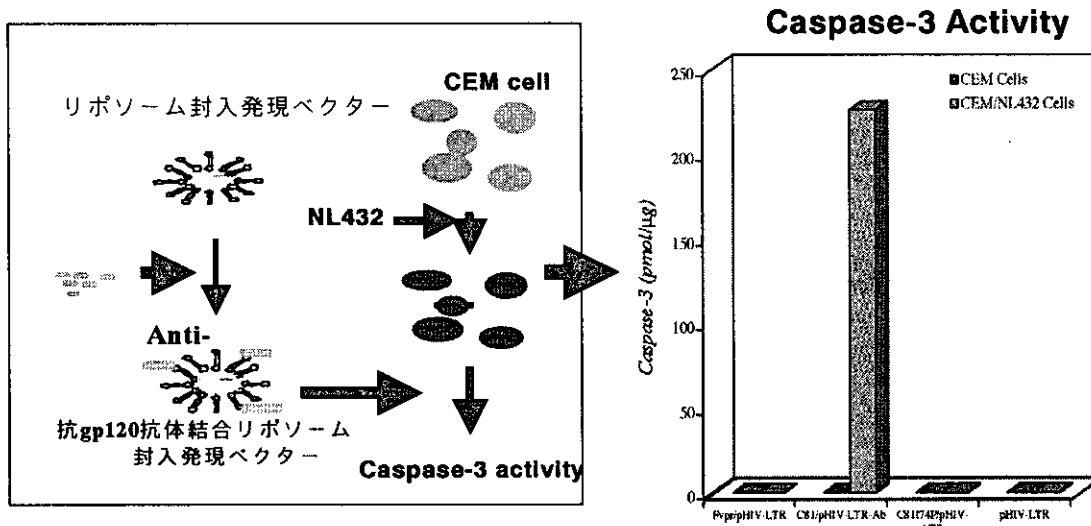


図1. 抗gp120抗体結合リポソームに封入した発現ベクターの導入前の実験と同様、pNL432をCEM細胞に感染させ、継代培養後、抗体結合リポソームに封入したC81発現ベクターを導入、オーバーナイトでCultivateし、その後Caspase-3の活性を測定した。グラフは左よりVpr, C81, C81I74P, コントロールベクターの順であり、それぞれ非感染細胞、感染細胞のCaspase-3の活性値を示す。

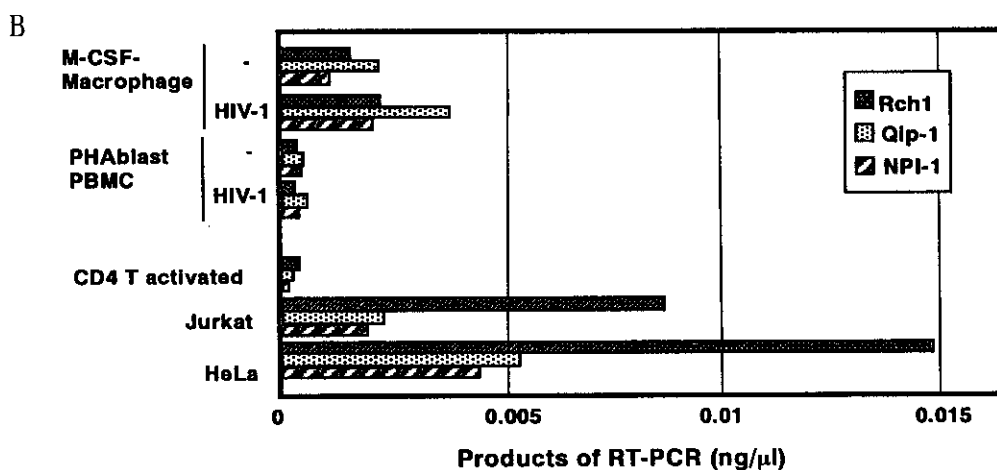
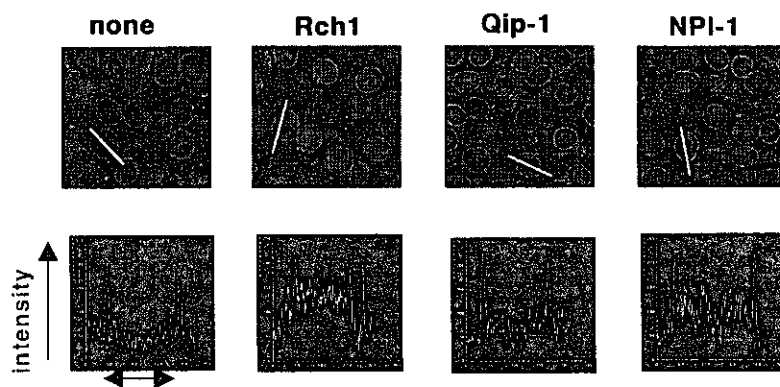


図3. 最終分化マクロファージに発現しているimportin α isoformを介した、Vpr核移行
 A. GST-N17C74-GFP とimportin α isoforms (Rch1, Qip-1 and NPI-1) による*in vitro* 核移行解析
 B. Importin α isoform mRNAの発現

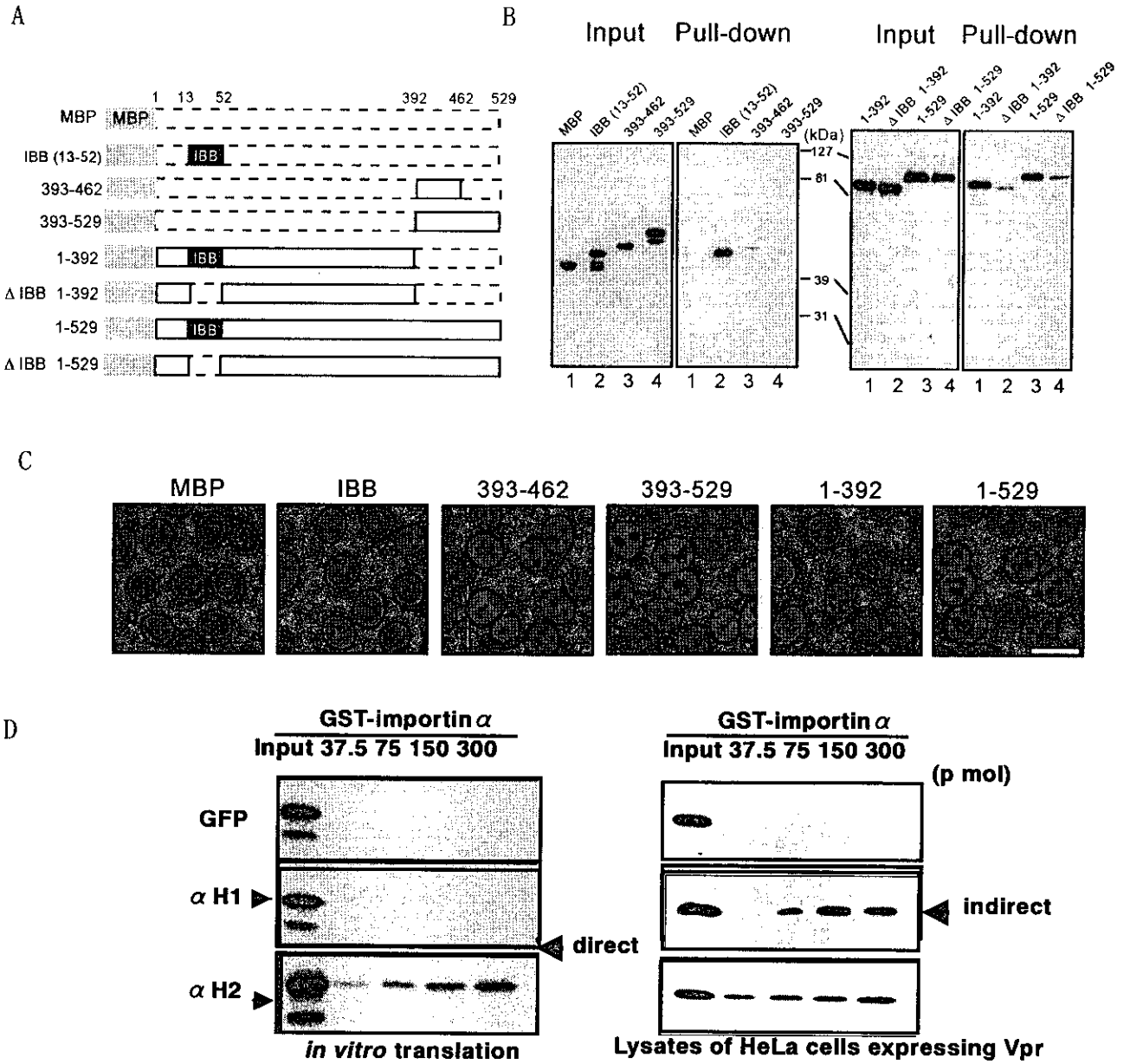


図 2. Vpr の核移行に要求される Vpr と importin α C 末側との間接結合
 A. 解析に用いた importin α の欠損変異体 B. GST 融合 N17C74 と importin α 変異体による GST-pull down 法 C. Importin α isoform 存在下での *in vitro* 核移行解析 D. *In vitro* translation および Vpr 発現 HeLa 細胞抽出液存在下での GST pull-down 法

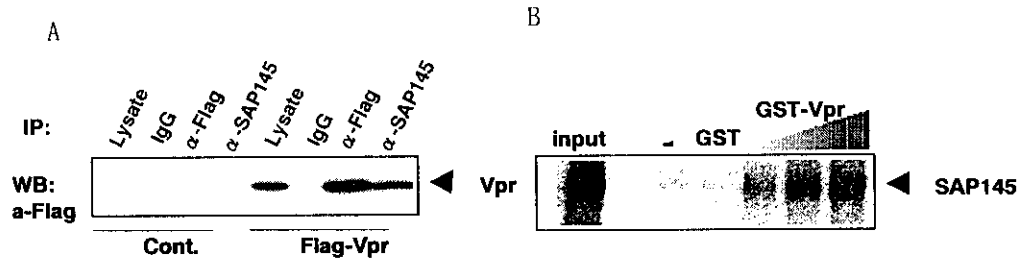


図4. VprとSAP145との結合

A. 免疫沈降法により、VprとSAP145との共沈を調べた。HeLa細胞より抽出したタンパク質溶液をもとに抗SAP145抗体により免疫沈降し、抗Flag抗体によりVprを検出した。B. GST pull down法により、VprとSAP145との結合を調べた。大腸菌で発現させたN末端GST融合Vprと、*in vitro* translationで ^{35}S ラベルし、合成したSAP145を用いた。

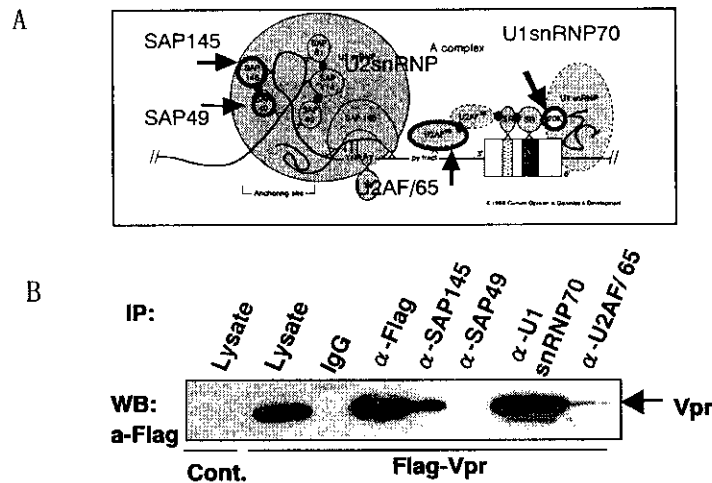


図5. Vprと他のスプライシング因子との相互作用

A. スプライシング中間体Acomplexの概念図。B. 免疫沈降法により、他のスプライシング因子との共沈を調べた。HeLa細胞より抽出したタンパク質溶液をもとに抗SAP49、抗U1snRNP70および抗U2AF/65抗体により免疫沈降し、抗Flag抗体によりVprを検出した。

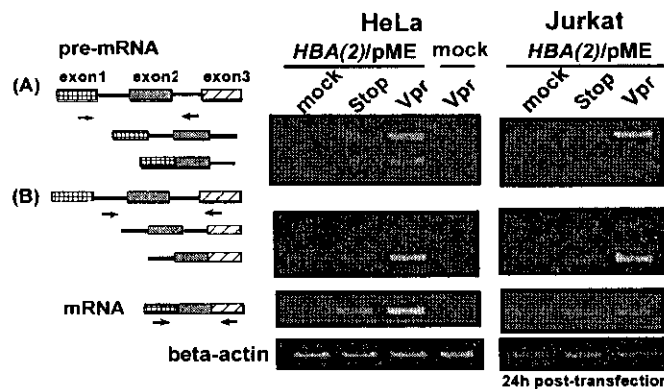


図6. Vprによる α -globin2 pre-mRNA splicingに与える効果

HeLa細胞(左)およびJurkat(右)にHBA(2)/pME18neo強制発現ベクターおよびFlag-Vprまたはコントロールベクターを共導入し、導入後24時間で α -globin2 pre-mRNA特異的プライマーでRT-PCRを行い半定量的にpre-mRNAの蓄積を比較した。exon1およびintron2特異的プライマーでintron2を持つpre-mRNAを増加した(A)。intron1およびexon3特異的プライマーでintron1を持つpre-mRNAを増加した(B)。exon1およびexon3特異的プライマーでmRNAを増幅した(C)。内部コントロールとして β -actinのRT-PCRを行った。

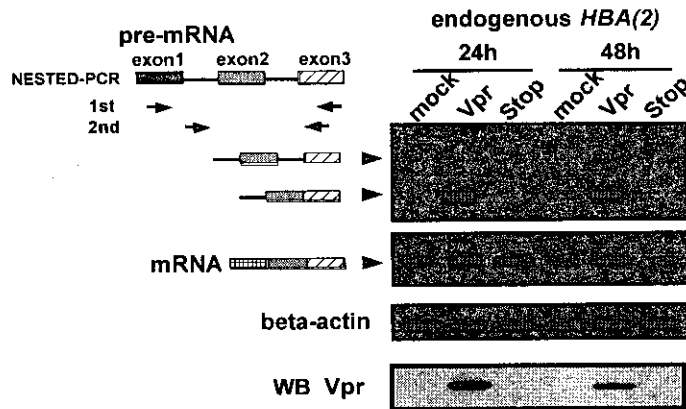


図7. Vprによる内在性 α -globin2 pre-mRNA splicingに与える効果
 HeLa細胞にFlag-Vpr/pME18neo またはコントロールベクターを導入し、 α -globin2 pre-mRNA 特異的プライマーでRT-PCRを行った。exon1とexon3特異的プライマーでの1st PCRの後、intron1およびexon3特異的プライマーで2nd nested-PCRを行いintron1を持つpre-mRNAを増加した(上段)。内部コントロールとして β -actinのRT-PCRを行った。抗Flag抗体によるwestern blottingでFlag-Vprを検出した。

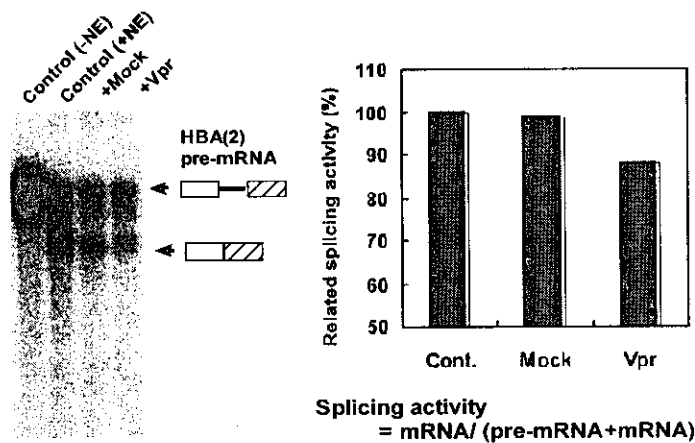


図8. in vitro splicing assay系におけるVprによる α -globin2 pre-mRNA splicing 阻害効果
 ^{32}P ラベルした α -globin2 pre-mRNAをHeLa核抽出液(NE)とともにインキュベートし、RNAを電気泳動後スプライシングの様子を検出した(左)。 α -globin2 pre-mRNAのみ(lane1)を、またさらにHeLa核抽出液を加えて(lane2)インキュベートしたもの。Mock核抽出液(lane3)、Flag-Vpr/pME18neo導入核抽出液(lane4)をそれぞれHeLa核抽出液に加えインキュベートしたもの。左図の結果を定量し、それぞれの抽出液中のsplicing activityを算出した(右)。

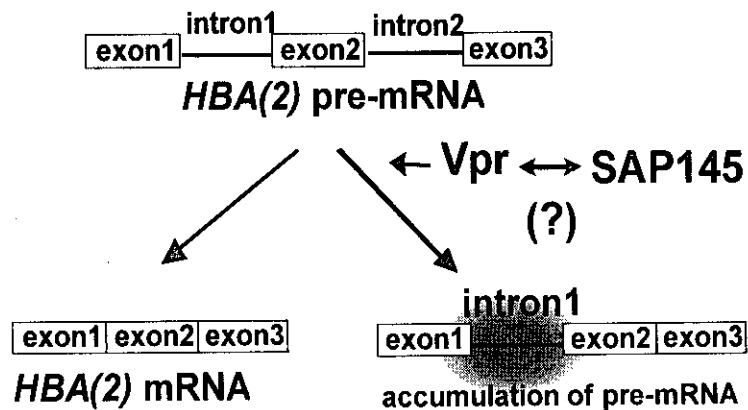


図9. Vprによる α -globin2 pre-mRNA splicing 阻害機構の模式図

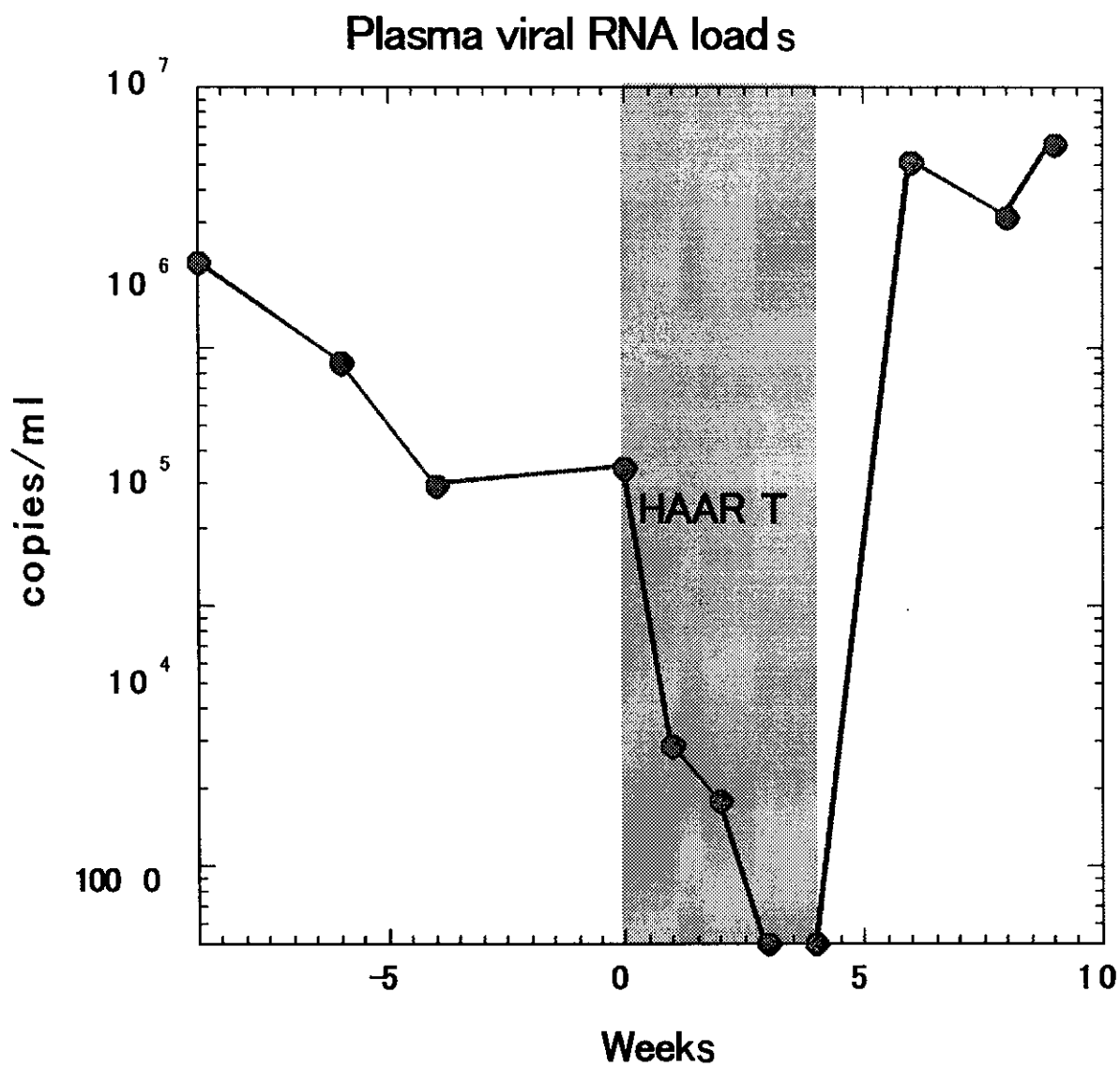


図 10. 多剤併用療法 (HAART) 処置サルにおける血漿中ウイルス量の推移。
 逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤を SHIV に持続感染しているサルに一日 2 回 4 週間連続経口投与したところ、投与開始後一週以内に血漿中ウイルス量が減少し、3 週後には検出限界以下になった。また、投与終了 2 週間後には、ウイルス量が投与以前のレベルに戻った。