

て、HIV の CTL からの回避メカニズムを細胞レベルで明らかにする実験を試みた。

CTL クローン 55 と 589 (以下、CTL55 または CTL589 と略す) は、同一の HIV-1 慢性感染患者の末梢リンパ球を HIV-1 逆転写酵素由来のエピトープペプチド (IPLTEEAEL) で刺激することによって取得した。このエピトープは、HLA-B\*3501 拘束性である。まず、HLA-B35 分子を発現するターゲット細胞に、このペプチドをパルスして、両 CTL クローンの細胞傷害活性を測定した。その結果、両クローンとも顕著な細胞傷害活性をペプチド濃度依存的に示したことから、両クローンの抗原特異性が確認された (図 1A)。ところが、HIV-1 感染細胞をターゲットとしたところ、CTL55 は細胞傷害活性を示さなかった (図 1B)。同時に測定した CTL589 は HIV-1 感染細胞を傷害することから (図 1B)、ターゲット細胞上にエピトープは提示されていると考えられた。次に抗ウイルス性サイトカインであるインターフェロンガンマ (IFN- $\gamma$ ) の抗原特異的産生能を評価した。細胞傷害活性のときとほぼ同様に、両クローンともペプチドをパルスしたターゲットに対しては IFN- $\gamma$  の産生を認めたが (図 2A)、CTL55 は HIV 感染細胞による刺激には応答しなかった (図 1B)。これらのことから、CTL55 は HIV 由来抗原に対して特異性は持ちながらも、HIV 感染細胞にエフェクター機能を発揮できないことが明らかとなった。

CTL55 の HIV 感染細胞に対する不応答性を引き起こす原因を探った。T 細胞の機能は、TCR の抗原認識、共刺激分子あるいは信号伝達分子に大きく影響される。まず両クローンの TCR 遺伝子をクローニングして構造を決定したところ、CTL55 および 589 はそれぞれ TCR V $\delta$ 1/V $\beta$ 13.3 および TCR V $\alpha$ 12/V $\beta$ 5.6 を持っていた。次にフローサイトメトリーによる表面抗原を解析したところ、両クローンとも、CD8 陽性の  $\alpha\beta$  T 細胞で、CD8 および CD3 分子の発現

量はほぼ同等であった。ところが、興味深いことに両クローンはテトラマーへの結合能が異なっていた。さらに、TCR V $\delta$ 1、TCR V $\alpha$ 12 に対する特異的な抗体を用いて、末梢リンパ球から両者をフローサイトメトリーで分画する測定系を構築した。その結果、テトラマーに高結合な分画ではほとんどが V $\delta$ 1 陽性 T 細胞であったのに対し、テトラマーに低結合な分画は V $\alpha$ 12 陽性 T 細胞で構成されていた (図 3)。TCR はそのリガンドであるペプチド・HLA 複合体に対して、あまりに強く結合すると、かえって T 細胞の活性化が減弱してしまうことが知られている。したがって、我々の結果は、HIV 特異的 CTL の抗ウイルス活性は、TCR の抗原認識の質的な変化に大きく影響されることを示している。こうした現象はこれまで報告されておらず、HIV の CTL からの逃避に新たな視点を与えるものと考えられる。

#### D. 考察

HIV 由来の抗原に対して特異性を持ちながらも、HIV 感染細胞に機能的に作用しない CTL を HIV 慢性感染者から同定することに成功した。このような CTL は、生体内で HIV の排除を行うことができないため、HIV の CTL からの逃避に関わっていると考えられる。さらに、HLA テトラマーとの詳細な相互作用解析から、TCR のペプチド HLA 複合体との結合が長すぎると、かえって T 細胞の抗原感受性を低下させ、結果として提示されている抗原量が少ない HIV 感染細胞に対するエフェクター機能を発揮できないことが示唆された。このような現象はこれまで報告されておらず、HIV による新たな CTL 逃避機構として注目される。一方、こうした CTL の抗原認識の質的変化がどのような分子機構で起こるのか明らかではない。エピトープ変異の影響や HIV 感染症の病態進行との関連をさらに解析することにより、HIV による CTL 回避のメカニズムを包括的に理解できるようになると

期待される。

#### E. 結論

TCRの抗原認識の質的变化は、生体内でHIVに対するT細胞による免疫応答の質に大きく影響することが分かった。HIV感染細胞に不応答なT細胞が、HIV慢性感染者で認められたことは、HIVのヒト免疫系からの逃避メカニズムに重要な示唆を与える。

#### G. 研究発表

##### ① 論文発表

- 1) Hossain MS., Tomiyama H., Inagawa T., Ida S., Oka S., and Takiguchi M. Identification and characterization of HLA-A\*3303-restricted, HIV-1 Pol-and Gag-derived cytotoxic T cell epitopes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 19; 503-510, 2003.
- 2) Ueno T., Tomiyama H., Fujiwara M., Oka S., and Takiguchi M. HLA class I-restricted recognition of an HIV-derived epitope peptide by a human T cell receptor  $\alpha$  chain having a V $\delta$ 1 variable segment. *Eur. J. Immunol.* 33; 2910-2916, 2003.
- 3) Yokomaku Y., Miura H., Tomiyama H., Kawana-Tachikawa A., Takiguchi M., Kojima A., Nagai Y., Iwamoto A., Matsuda Z., and Ariyoshi K. Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Epitope is a Major Escape Mechanism from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* 78; 1324-1332, 2004.
- 4) Tomiyama H., Takata H., Matsuda T., and

Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: An inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur. J. Immunol.* In press.

##### ② 学会発表

- 1) Ueno T., Tomiyama H., Fujiwara M., Takiguchi M. HIV-specific cytotoxic T lymphocyte clone unable to kill HIV-infected cells shows increased binding capacity to peptide-HLA complex. The Second International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis and Treatment (Paris, France) July 13-16 (2003).
- 2) Takiguchi M. HIV-1 escape from HIV-1-specific CD8 T cells in individuals with HIV-1 infection. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuizawa, Japan) September 16-19 (2003).
- 3) Fujiwara M., Tomiyama H., Takiguchi M. Effect of Nef-mediated HLA class I down-regulation on ability of HIV-1-specific CD8+ T cells to suppress HIV-1 replication. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and Conference (Karuizawa, Japan) September 16-19 (2003).
- 4) Satho M., Takamiya Y., Oka S., Tokunaga K., Takiguchi M. Identification of HIV-1 CD8 T cell epitopes presented by HLA-A\*2601. 7th Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop and

Conference (Karuizawa, Japan)  
September 16-19 (2003).

- 5) Takata H., Tomiyama H., Takiguchi M.  
Characterization of HCMV-specific CD8 T  
cells using HLA-A\*02 tetramers. 7th  
Asia-Oceania Hitocompatibility Workshop  
and Conference (Karuizawa, Japan)  
September 16-19 (2003).
  
- 6) Takiguchi M. HIV-1 escape from  
HIV-1-specific CD8 T cells in individuals  
with HIV-1 infection. International  
symposium "Infection and Immunity" in  
annual meeting of Japanese Society of  
Immunology (Fukuoka, Japan) December  
8-10 (2003).

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当なし

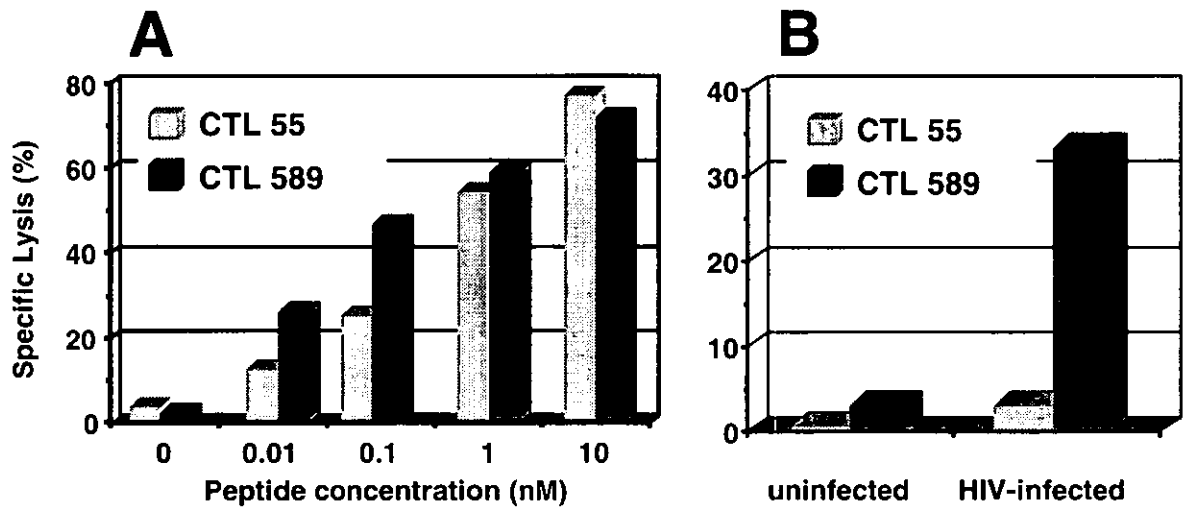


図1 CTLクローンの細胞傷害活性

図中に表示した濃度のペプチドをパルスした細胞 (A) あるいは HIV 感染細胞 (B) をターゲットとして、CTL55 および CTL589 の細胞傷害活性を  $^{51}\text{Cr}$  放出法により測定した。

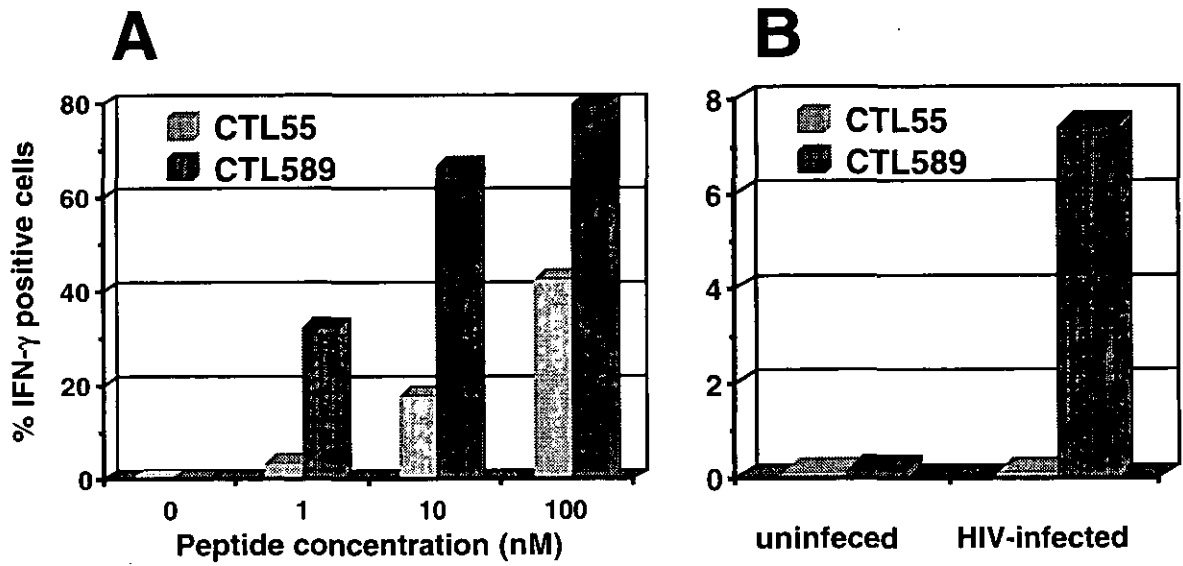


図2 CTLクローンのインターフェロンガンマ産生活性

図中に表示した濃度のペプチドをパルスした細胞 (A) あるいは HIV 感染細胞 (B) をターゲットとして、CTL55 および CTL589 のインターフェロンガンマ産生能を細胞内染色法により測定した。

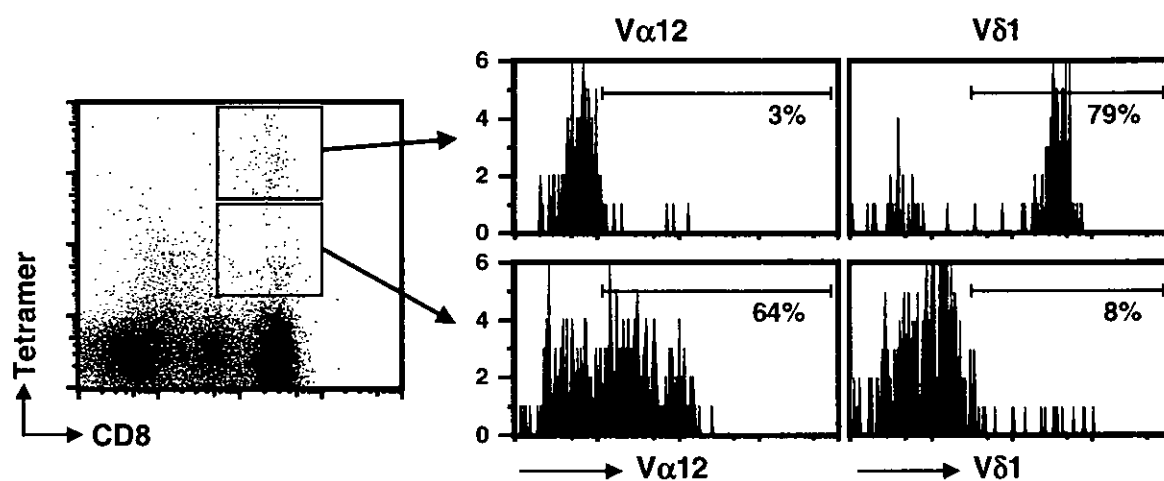


図3 テトラマー陽性 CD8 T 細胞のテトラマー結合活性の相違

HIV 感染者の末梢リンパ球をテトラマー、抗 CD8 抗体および図に表示した抗 TCR 抗体で染色後、フローサイトメトリーで解析した。テトラマー陽性画分をテトラマーに対する結合活性で 2 つに分画後、それぞれに含まれる T 細胞サブセットをさらに TCR の違いによって解析した。

厚生労働省エイズ対策研究事業（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

HIV 感染症の病態と宿主の免疫応答の研究

分担研究者 松下修三 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 教授

研究要旨

昨年度までに我々は自己由来の分離株に対する中和抗体活性を持つ HIV 感染症例で、HAART 療法下にウイルスのリバウンドが見られた症例の臨床分離株の gp120-C3 領域の変化が、中和抗体反応に影響することを報告した。本年度は、15 種類の中和単クローン抗体を用いて、C3 領域の変化と単クローン抗体の反応性の違いを調べた。その結果、i) V3 の立体構造エピトープを認識する中和単クローン抗体である 2442 の中和活性が C3 の変異に影響を受けること、ii) 中和抵抗性のウイルスにも結合活性は保存されていること、がわかった。すなわち、Gp120 の C3 領域が、V3 を含んだ立体構造エピトープに対する抗体の中和抵抗性メカニズムに影響していることを、中和単クローン抗体を用いて明らかにした。これらの研究は有効な免疫療法の開発ばかりでなく感染阻止ワクチンの開発に大きな意義を持つといえる。

A. 研究目的

有効な抗ウイルス剤多剤併用療法（HAART）下に残存するウイルスの性質を調べ、これに対する宿主の免疫応答を解析し、発症阻止を目指した新規治療法を開発するのが本研究の目的である。我々は中和抗体の臨床応用を計画中であるが、*in vivo* での中和エスケープの研究は、長期非進行例にみられる有効な中和抗体の誘導を目指すうえでも極めて重要である。本年度は臨床株の gp120-C3 領域の変化が、どのような中和抗体反応に影響するかを調べた。

B. 研究方法

自己由来の分離株に対する中和抗体活性を持つ HIV 感染症例で、HAART 療法下にウイルスのリバウンドが見られた症例を 4 例経験した。HAART 開始時及びリバウンド時の血漿より RT-PCR にて HIV-gp120 を増幅し、多クローン解析でアミノ酸配列を決定し系統樹解析を行った。リバウンド前後の gp120 のアミノ酸配列をもつ組み換えウイルスを複数作成し患者血漿から精製した IgG を用いて、MAGI-CCR5 細胞を標的細胞として、それぞれのウイルスに対する中和活性を測定した。さらに中和感受性ウイルスと中和抵抗性ウイルスクローンよりリコンビナントエンベロープを作製し、中

和抵抗性変化に関連する部位を同定した。gp120 の立体構造エピトープに反応し、感染を中和する単クローン抗体 15 種類を用い HAART 開始前とリバウンドウイルス及びそれらのキメラウイルスに対する中和活性を測定した。中和抵抗性ウイルスと感受性ウイルスのエンベロープ蛋白への中和単クローン抗体の結合活性を調べるためにそれぞれのエンベロープ遺伝子を pLP-env-IRES-EGFP ベクターに導入し GFP 発現細胞にゲートをかけて FACS にて分析した。Virus-capture assay では単クローン抗体をプレートに結合後に、段階希釈したリコンビナントウイルスをインキュベートし、プレートに Capture されたウイルスを p24 測定によって求めた。

(倫理面への配慮)

本研究を行うに当たり各症例には研究の概要を説明し同意を得た上で採血し解析した。なお本研究の倫理的・科学的妥当性は熊本大学付属病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。

C. 研究結果

我々は昨年までに自己の分離株に対する中和抗体をもつ症例を継続的に観察し、HAART にて長期に亘りウイルス血症の抑制が得られた中で、ウイルスのリバウンドが認められた 4 症例を解析した。

その結果、*in vivo* での中和エスケープには V1/V2 や V3 などの可変部位ばかりではなく、定常部位である C3 領域の変異が影響することを示した。しかし、C3 領域に対応する合成ペプチドに反応する抗体は検出されず、C3 領域はリニアエピトープを形成しないと考えられることから、この中和エスケープには何らかの立体構造を認識する抗体の関与が考えられた。*In vivo* での選択圧となっている抗体の性質を調べるために、我々は gp120 の立体構造を認識して中和する単クローン抗体の HAART 前のウイルス (pMOK10) 及びリバウンド時のウイルス (rMOK10) に対する中和能を検討した。単クローン抗体としては、CD4 結合部位に対する抗体や、gp120 が CD4 に結合後に出現するエピトープに対する抗体、さらに V3 を含んだ立体構造を認識する抗体などを準備した。この結果中和活性に差のあるものが、数種類同定できた。本年度はさらに、これらの組換えウイルスの V3/C3 領域を更に組換えた rMOKV3/C3 (pMOK10 の V3/C3 のみリバウンド型)、rMOKC3 (pMOK10 の C3 のみリバウンド型) の中和を詳細に検討した。これらの中で V3 の立体構造を認識する単クローン抗体の一つ、2442 が C3 及び V3/C3 のアミノ酸変化にて中和感受性が変わることがわかった。2442 の中和は HIV 感染症例の中和抗体とは逆に HAART 開始前のウイルスが中和抵抗性であり、V3/C3 及び C3 がリバウンド型となると中和感受性が増加した。一方、他の V3 の立体構造を認識する単クローン抗体 2182 やリニアエピトープと認識する 477-52D はリバウンドウイルス (rMOK10) のみ感受性で新しく作成した V1/V2 をリバウンド型に組み替えた rMOKV1/V2 を含む他の組み換えウイルスは全て中和抵抗性であり、V3 に反応しておこるウイルス感染の中和には downstream C3 および V4 に中和抵抗性を与える領域があると考えられた。これらの組み換えエンベロープをさらに pLP-env-IRES-EGFP ベクターに組み替えて発現を標準化した後に FACS 分析で単クローン抗体に対する反応性を比較すると、中和感受性のある r10 と V3/C3 への結合活性は C3 や p10 より反応性が高い傾向があった。我々はさらに、solid phase virus capture assay で、ウイルス粒子上のエンベロープに対する反応性を検討している。

#### D. 考察

*In vivo* における中和抗体からのウイルスのエスケープの研究は少ない。我々の研究は、抗体の反応エピトープ以外のアミノ酸の変化が中和抵抗性に関係することを示すが、細胞表面のエンベロープに対する結合活性については中和抵抗性のウイルスについても保たれており、ウイルス粒子上のエンベロープに対する反応性の検討が必要である。C3 の変異による中和抵抗性のメカニズムとしてはエンベロープの立体構造変化や糖鎖の変化が抗体の accessibility に影響するのではないかと考えられた。

#### E. 結論

我々は gp120 の C3 領域が *in vivo* における中和抗体からのエスケープに関与することを証明するとともに、V3 を含んだ立体構造エピトープに対する抗体の中和抵抗性メカニズムを明らかにした。これらの研究は有効な免疫療法の開発ばかりでなく感染阻止ワクチンの開発に意義を持つ。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Yoshimura, K., Ido, E., Akiyama, H, Kimura, T., Aoki, M., Suzuki, H., Mitsuya, H., Hayami, M., Matsushita, S. The impact of highly active antiretroviral therapy by the oral route on the CD8 subset in monkeys infected chronically with SHIV<sub>89.6P</sub>. *J. Virological Methods.* 112:121-128, 2003.
2. Koito A, Kameyama Y, Cheng-Mayer C, Matsushita S. Susceptibility of mink (Mustelavision)-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type-1. *J. Virol.* 77:5109-5117, 2003.
3. Koito, A., Shigekane, H., and Matsushita, S. Ability of small animal cells to support the postintegration phase of human immunodeficiency virus type-1 replication.



Virology, 305:181-191, 2003.

## 2. 学会発表

1. Matsushita S., Kimura T., Shirai N., Koito A., Yoshimura K.: Evaluation of residual viral replication for optimization of HAART. 1<sup>st</sup> International Workshop on HIV Persistence during Therapy. 12.10-12, 2003, Saint Martin, FWI.
2. Yoshimura K, Kimura T, Matsushita S: Proviral DNA (pDNA) and turn over levels in HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 2003 International Meeting of the Institute of Human Virology. 9.29-10.3 2003, Baltimore, U.S.A.
3. Matsushita S. Status of HIV/AIDS in Japan. International Symposium of the Foundation of East Asia Network on HIV. 9.26, 2003, Seoul, Korea.
4. Matsushita S.: Anti-HIV immunity of patients with long-term viral suppression by HAART. U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program 15<sup>th</sup> Joint Meeting of the AIDS Panels, 3.5-7, 2003, Okinawa.
5. 吉村和久、木村哲也、松下修三: Proviral DNA (pDNA) and turn over levels in HIV-1-positive long-term non-progressors (LTNPs). 第17回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸
6. 木村哲也、吉村和久、祁内 梓、小糸 厚、松下修三: HIV エンベロープ C3 変異による抗 HIV 中和抗体からの逃避. 第17回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸
7. 祁内 梓、木村哲也、吉村和久、小糸 厚、松下修三: HIV-nef 融合蛋白を用いた細胞性・液性免疫の誘導. 第17回日本エイズ学会学術集会・総会、11.27-29, 2003, 神戸

## H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

なし

## 厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

## 分担研究報告書

## エイズ発症阻止に関する研究

分担研究者 竹森 利忠 国立感染症研究所免疫部部長

研究協力者 藤猪 英樹 国立感染症研究所免疫部研究員

## 研究要旨

成熟 T 細胞により構築される生体の免疫系に与える HIV nef の影響を解析することを目的に、nef 組込みアデノウイルスを作製した。OVA 特異的 T 細胞レセプターを発現し、コクサキ・アデノウイルス受容体を発現した double Tg マウスより CD4<sup>+</sup> T 細胞を精製し、ウイルス感染後その機能と性状を報告した。この結果、OVA ペプチド刺激による T 細胞増殖とサイトカイン産生量は nef 発現により低下し、さらに SDF-1、MIP-1 への遊走能が顕著に抑制された。また同系マウスに移入された nef 発現 CD4<sup>+</sup> T 細胞は OVA/CFA 免疫後の所属リンパ節への集積が著しく減少することが明らかにされた。これらの結果は、成熟 T 細胞での nef 発現は、生体内での細胞動態と免疫反応に大きく影響を及ぼす可能性が示唆された。

## A. 研究目的

HIVnef はウイルス感染後の病態発症の主要要因の一つとして考えられている。HIVnef 発現により CD4 と MHC class I 分子の発現抑制、およびウイルス産生増強が報告され、HIVnef は感染細胞の免疫系からの逃避とウイルス産生増加に関わることが予想される。しかし nef の AIDS 発症における病原性誘導の機序は明らかでない。Nef トランスジェニック(Tg)の免疫学的解析により、ウイルス粒子産生なしに CD4<sup>+</sup> T 細胞減少をはじめとする AIDS 様症状が誘導されて死亡する可能性が示唆され、nef 分子自身が in vivo で病原性発症に関与することが示唆された。しかしこの系では nef の発現が幼若 T 細胞より誘導されており、通常の HIV 感染による nef 発現の状態とは大きく異なる。我々は成熟 T 細胞に

より構築される生体の免疫系に与える nef の影響を in vivo で検討することを目的に、nef 組込みアデノウイルスを用いて nef 発現成熟 CD4<sup>+</sup> T 細胞の機能変化を検討するモデルシステムを構築し、HIV 感染において成熟 T 細胞で発現する HIVnef が生体での免疫不全発症にどのように関与するかを明らかにし、免疫不全発症抑制の対策を考慮する。

## B. 研究方法

Nef 遺伝子組み込みアデノウイルスベクター作成の手段には Tong-Chen らの提供する A Simplified System for generation of Recombinant Adenoviruses を用いた。アデノウイルス作成過程では、E1E3 遺伝子を持つ野生株の出現が問題になるが、E1E3 非発現 HeLa 細胞を用いて野生

株の出現がないことを確認した。

CD4<sup>+</sup> T細胞の調製: CD4<sup>+</sup> T細胞は DO11.10 TCR transgenic(Tg) マウスと、Coxsackie/Adenovirus Receptor(CAR)Tg マウスをかけ合わせた double Tg マウスの脾臓、リンパ節より、磁気ビーズを用いたカラム分離法によりネガティブに調製した。

ウイルス感染と nef 発現細胞の分離: 精製した CD4<sup>+</sup> T細胞を 24 穴プレートにまき、IL-7 存在下にて nef 組込みアデノウイルスを MOI 20 にて 2 時間感染させた。その後 2 日間培養し、EGFP と CD4 の発現量を指標に FACS を用いて nef 発現細胞と nef 非発現細胞とに分離した。

細胞増殖試験とサイトカイン産生測定: 新たに調整した正常マウスのγ線照射脾臓細胞に OVA<sub>323-339</sub> ペプチドをパルスし、分離した nef 発現、nef 非発現細胞と共培養を行い、経日的に [<sup>3</sup>H] Thymidine の取込みをシンチレーションカウンターにて測定した。また同時に培養上清中の IFN-γ の産生量を ELISA にて測定した。

ケモタキシスの測定: ChemoTx 96 穴ケモタキシスチャンバーを用いて測定した。分離した nef 発現、nef 非発現細胞をメンブレンの上面に置き、下室に SDF-1、MIP-1 を入れ、それぞれの走化性因子に対するケモタキシスを下室に遊走してくる細胞数を数えることで測定した。

分離した nef 発現、nef 非発現細胞を同系マウスの BALB/c に 1x10<sup>6</sup> 個尾静脈より移入し、移入翌日に OVA を完全フロイントアジュバントと共に背部皮下に免疫した。免疫後 5 日目に所属リンパ節に集積した移入細胞数を FACS にて測定した。

#### (倫理面への配慮)

全ての動物実験は国立感染症研究所動物実験施設の SPF 区で維持飼育を行ない、倫理面も含めて、国立感染症研究所動物実験委員会の審査を受け、その承認を得てから開始した。

#### C. 研究結果

精製 CD4<sup>+</sup> T細胞に nef 組込みアデノウイルスを IL-7 存在下において、MOI 20 の条件下で感染させた。感染 2 日後、EGFP と CD4 の発現量を指標に FACS を用いて nef 発現細胞と nef 非発現細胞とに分離した。EGFP が発現し、CD4 の発現が抑制される nef 導入細胞はおよそ 60% であり、その細胞の nef 発現はウェスタンブロットにて確認できた (図 1)。

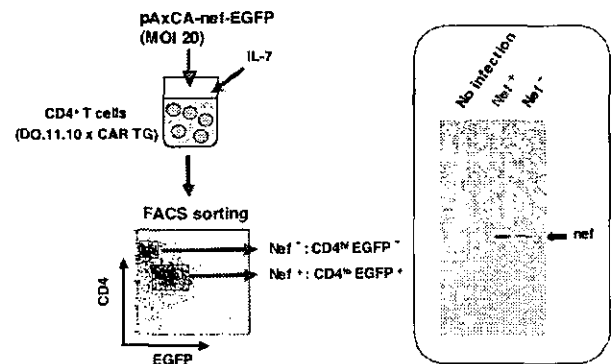


図 1. nef 発現細胞と非発現細胞の調製

Nef 発現 T 細胞の抗原刺激による免疫反応を検討する目的で、新たに調整した正常マウスのγ線照射脾臓細胞に OVA<sub>323-339</sub> ペプチドを 0.1μM、1.0μM、10μM の濃度でパルスし、分離した nef 発現、nef 非発現細胞と共培養を行った。刺激後の細胞増殖を [<sup>3</sup>H] Thymidine の取込みを指標に測定すると、両者とも経日的な増殖が見られたが、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べてその増殖が有意に遅延することが明らかとなった (図 2a)。同一条件下で各細胞が培養上清中に産生する IFNγ の量を ELISA にて測定したところ、いずれの OVA 濃度においても nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べてそのサイトカイン産生量が有意に減弱することが明らかとなった (図 2b)。

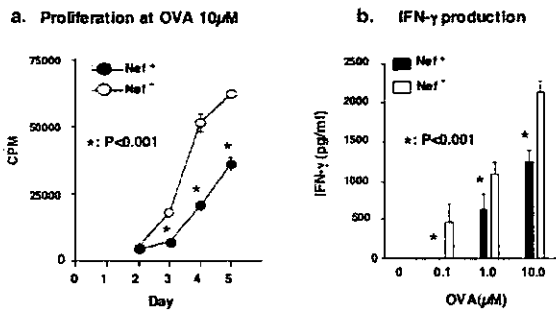


図2. Nef発現による抗原特異的T細胞反応に及ぼす影響

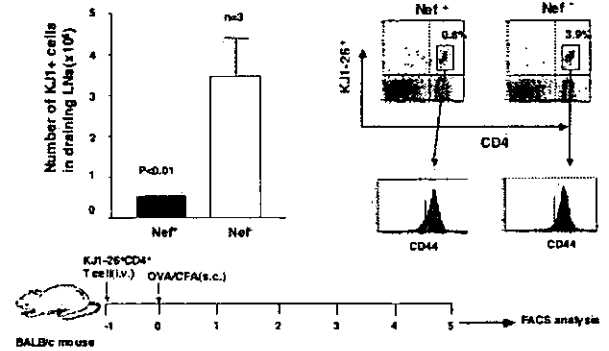


図4. Nef発現による抗原提示部位への集積に及ぼす影響

さらに SDF-1、MIP-1 への遊走能を ChemoTx 96 穴ケモタキスチャンパーを用いて測定したところ、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べて SDF-1 への遊走が著しく減少した。さらに MIP-1 への遊走も有意に減少することが明らかとなった (図3)。

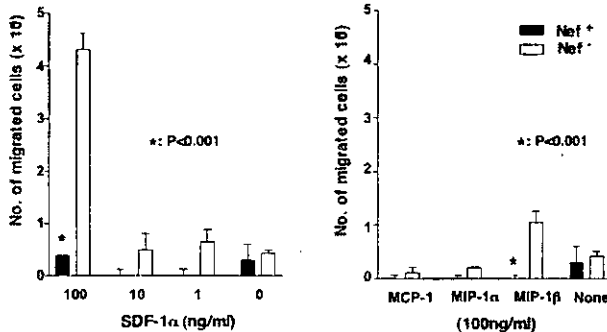


図3. Nef発現によるT細胞ケモタキスに及ぼす影響

同系マウスに nef 発現細胞あるいは nef 非発現細胞を移入し、OVA/CFA で免疫後の所属リンパ節への移入細胞数の集積を測定したところ、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べて所属リンパ節への集積が著しく減弱することが明らかとなった (図4)。

以上の結果より、成熟 T 細胞での nef 発現は、生体内での細胞動態と免疫反応に大きく影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### D. 考察

HIV ウィルス感染初期に誘導される免疫異常や免疫不全に nef の発現が重要な役割を果たすことはこれまでに多くの試験管内の実験から推測されている。Nef の発現により CD4 抗原、MHC class I の発現低下をはじめ、細胞内シグナル分子との結合によりアポトーシス阻害の誘導等が報告されているが、しかし nef が個体レベルでどのような機序で免疫不全に関わるか不明であった。

Nef トランスジェニックマウスにおいて、AIDS 様病態の発症に伴う免疫反応異常が認められるという報告があるが、nef の発現が胸腺内分化における T 細胞から発現しているの、これらの結果が、胸腺内 T 細胞分化異常を反映するかあるいは免疫反応時における T 細胞機能異常を反映するか明かでない。

本研究成果はこの問題を理解する上で重要な情報を提供しつつある。すなわち、我々が確立した nef 組込みアデノウイルスの感染モデル系を用いて、nef 発現 T 細胞の抗原刺激に対する反

応の減弱、SDF-1、MIP-1 への遊走能の低下、さらに生体内における抗原刺激への応答性とダイナミクス異常が起きている可能性を示した。今後これらの異常が、nef 発現を契機とする T 細胞機能異常が CD4 発現抑制に伴う二次的な現象か否か検証する目的で、CD4 発現抑制機能を欠いた nef 発現アデノウイルスを作製し実験に供する。さらに、Nef 発現による生体内での T 細胞のダイナミクス、および免疫記憶を含む免疫反応への影響をどのような免疫阻害が誘導されるか個体レベルで明らかにし、情報を集積し、nef 発現によって機能異常をきたした T 細胞を排除する方策を模索することが重要な課題であると考えられる。

#### E. 結論

成熟マウス T 細胞への Nef 発現により、抗原提示細胞を介した抗原刺激に依存する細胞増殖とサイトカイン産生量が減弱したことから、nef 発現が成熟 T 細胞機能の異常を誘導する可能性が示唆された。さらに nef 発現により SDF-1、MIP-1 への遊走が抑制され、in vivo で抗原刺激後に所属リンパ節に集積する活性 T 細胞数は nef 発現により減少する。これらの結果は、nef 発現が CD4<sup>+</sup> T 細胞の生体内組織におけるダイナミクスや抗原特異的免疫応答に影響を及ぼす可能性が強く推察された。

#### 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

- (1) 藤猪英樹、藤井陽一、竹森利忠 「HIVnef による成熟 T 細胞の機能異常」第 52 回日本ウ

イルス学会総会、2003 年 10 月

- (2) 藤猪英樹、中山俊憲、谷口克、竹森利忠 「HIVnef 発現により誘導される成熟 T 細胞の機能異常」第 33 回日本免疫学会総会、2003 年 12 月

- (3) H. Fujii, T. Nakayama, M. Taniguchi, T. Takemori : Expression of HIVnef impairs the antigen-specific T cell response. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, 2003

- H. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)  
なし

厚生労働科学研究補助金（厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
分担研究報告書

H I V 遺伝子の核内移行分子メカニズムの解明

小柳義夫 京都大学ウイルス研究所感染病態研究領域  
蝦名博貴 東北大学医学系研究科微生物学分野

研究要旨

HIV が細胞内に侵入後、その RNA ゲノムが逆転写され cDNA 合成後核内に移行して、染色体にインテグレーションするまでの過程には種々の細胞因子が関与すると考えられている。その中でも cDNA の核内移行メカニズムはほとんど明らかになっていない。そこで、ウイルス cDNA の核内移行に必須な細胞因子の検索を行った。Aphidicolin の処理により G<sub>1</sub> 期に細胞周期を停止させた細胞へ HIV ベクターを感染させた場合においても、その cDNA が極めて効率よくインテグレーションされることが確認された。この結果は HIV は核膜が存在している状態でも効率よく核内へ移行し、インテグレーションすることがわかった。すなわち、細胞質と核内をつなぐ唯一の経路である核膜孔を通過していると考えられる。そこでこの核膜孔複合体の構成蛋白質の中でも代表的な Nup107、Nup214、p62、Nup98、Nup153 の発現を siRNA 法で抑制し、ウイルスの感染に影響を及ぼすか否かを検討したところ、Nup98 の発現抑制細胞においては最も強力な HIV 感染抑制が見られた。そこで、HIV-1 cDNA の核内移行効率を当研究室が開発した PCR 法により測定したところ、Nup98 抑制細胞における HIV のインテグレーション効率はコントロールに比べ有意な低下が確認された。また、Nup98 の機能を特異的に阻害する VSV-M 蛋白質が導入された細胞内においても同様にインテグレーション効率は有意に低下した。以上の結果から、Nup98、もしくはそれに関連する細胞因子が HIV-1 cDNA の細胞質から核内への輸送過程において重要な役割を果たしていることが判った。この結果は新たに HIV 感染に関与する細胞因子を見出したといえ、エイズ発症抑制のための新たな標的となる。

A. 研究目的

レンチウイルス属である human immunodeficiency virus (HIV) は他のオンコウイルス属のレトロウイルスと異なり、静止期の細胞にもその染色体にウイルス DNA をインテグレートさせる事ができることから、非分裂細胞への遺伝子治療へ応用可能なウイルスベクターとして注目を集めている。この細胞への感染性獲得は、ウイルス側因子としてウイルスゲノムの核内移行能力によると考えられる。ウイルス RNA は標的細胞に侵入後、細胞質内において逆転写され、cDNA を合成後、ウイルス構成蛋白質のマトリックス (MA)、Vpr、インテグレ

ース (IN) と共にコンプレックス (Pre-integration complex: PIC) を形成する。HIV cDNA はこの PIC を形成することにより核内移行能を獲得すると考えられ、そのため MA、Vpr、IN それぞれを単独の蛋白質の核内移行活性を検討する解析がこれまで精力的に行われてきた。その結果、これら PIC の構成蛋白質はそれぞれ核内移行シグナルを持っていることが明らかとなっている。一方、最近細胞側因子として Importin ファミリーの中でも、リボソーム蛋白やヒストン H1 の核内移行に関与する Importin 7 が HIV cDNA の核内移行に重要な核内移行因子であるとの報告がなされた。また、

PICは沈降係数300Sで直径56nmにも及ぶ巨大な分子であり、INI1やBAF1をはじめとして数多くの宿主因子もPIC内に感染後取り込まれ、その構成蛋白質としてHIV感染に関与していると報告されている。このようにHIV cDNAの核内移行にはウイルス側因子はもちろん、様々な細胞側因子が関与しており、その核内移行メカニズムは非常に複雑であるため、HIV cDNAの核内移行の全貌は未だに多くの未知である。蛋白質単体の核内移行ならびに核外輸送のメカニズムは最近徐々に解明され、種々分子メカニズムが介在することが分かってきた。その中で特にSV40ウイルスのラージT抗原中に見つかった核内移行シグナル(NLS)と、それに結合し核内に蛋白質を運ぶ輸送担体として見つかったImportin $\alpha$ 、 $\beta$ 、及びHIVのRevに存在するNESとそれを輸送するCRM1の発見により、核細胞質間輸送経路の研究は急速に発展し、それぞれの分子特異的な輸送経路が明らかになってきている。最近、この輸送担体としてImportin $\beta$ ファミリーを形成する多数の分子が続々とあらたに発見されている。

一方これら輸送担体の研究に加え、核内と細胞質をつなぐ唯一の経路は核膜内に埋め込まれた核膜孔であり、その核膜孔は、50種類にも及ぶNucleoporin蛋白質が巨大な核膜孔複合体を形成することにより維持されており、その分子メカニズムも明らかになってきた。その形状は8対称性の構造体であり、細胞質側にはCAN/Nup214と呼ばれるフィラメント状の突起が伸びており、核内側にはNup153、Nup98などで構成されたバスケット上の構造を持つ。また、核膜孔の中心部にはp62が位置している。これら、核膜孔複合体を形成するNucleoporin蛋白質の多くはフェニルアラニンとグリシンの残基であるFG-repeatと呼ばれる領域を持っており、このFG-repeatに輸送担体と、RanGDP/GTPが結合し核輸送は制御されている。

この核膜孔複合体はいくつかのサブコンプレックスの集合体であり、Nup88、Nup107、Nup98、Nup85といったNucleoporin蛋白質の発現抑制は核膜孔複合体の構築を阻害し、その機能を低下、もしくは完全に阻害してしまうことが報告された。

本研究では、今日まで行われてきたような、PIC構成蛋白質単体の解析ではなく、核膜孔複合体構成蛋白質を主体とした新たな視点からのHIV-1 cDNAの核内移行メカニズムの解明を試みた。

本研究の目的はHIVというレトロウイルスがどのような細胞内輸送経路を利用して、細胞質から核内へ移行して染色体にインテグレーションされるのか、その分子メカニズムを明らかにすることである。本研究では、新たなAIDS治療法の開発に貢献するためにPICの核内移行メカニズムの解明を、特にNucleoporinの関与を明らかにすることを目的とした。

## B. 研究方法

### 1) 遺伝子導入

10%子牛血清を含むD-MEMにて培養したヒト293T細胞およびHeLa細胞に対して遺伝子導入を行った。HeLa細胞への遺伝子導入はLipofectamin2000 (Invitrogen)を用いた。2 $\mu$ gのsmall interfering (si) RNA発現プラスミドを遺伝子導入後、72時間に細胞を免疫染色による解析を行った。293T細胞への遺伝子導入はリン酸カルシウム法を用いた。4 $\mu$ gのsiRNA発現プラスミド及びVSVマトリックス蛋白(VSV-M)発現プラスミドDNAを遺伝子導入72時間後にウイルスベクターを感染させ、さらに、24時間後にDNAを回収し、ウイルスDNA量をReal-Time PCRにて定量した。

### 2) Real-Time PCRによるウイルスDNAの定量法

完全長cDNA及び1-LTR環状cDNA、2-LTR環

状 cDNA、細胞染色体にインテグレーションした cDNA をそれぞれに特異的なプライマーを用いて定量した。Integrated form は、ヒトの遺伝子上に一定の間隔で存在すると言われる Alu 配列と HIV-1 の LTR 領域それぞれに特異的なプライマーを用いた 1<sup>st</sup> PCR 産物を 1000 倍に希釈したものに対して、HIV-1 の LTR 領域特異的なプライマーを用いて定量した。細胞の DNA 量を  $\beta$  アクチン特異的なプライマーを用いて定量することにより、細胞当たり存在する HIV-1 cDNA 量を算出した。

### 3) 細胞周期の解析

細胞周期を G1-S 期で停止するために DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  阻害剤の Aphidicolin を用いた。5  $\mu$ g/ml の aphidicolin で 24 時間処理した MT-2 細胞にウイルスベクターを感染させ、24 時間後に核酸を抽出し、HIV cDNA を上述した Real-Time PCR 法にて定量した。細胞周期は PI (propidium iodide) で染色した細胞核の DNA 含有量を flow cytometry にて解析した。

### 4) プラスミド DNA の構築

本研究で用いた RNAi 法は、プラスミド DNA に挿入した RNA ポリメラーゼ III である U6 プロモーターにより転写されたステムループ構造を形成する small interfering RNA (siRNA) 前駆体から 21nt の 2 本鎖 RNA を発現する。U6 プロモーターの下流の BfuAI 領域に以下のオリゴヌクレオチドを挿入した。siRNA である 21nt の配列選択基準は、目的の遺伝子配列から AAGN20 の配列を探し、極端な GC リッチ領域を避け、AAAA 及び TTTT を含まず、さらに他の mRNA の配列と重複しない配列の G から始まる 21nt の領域を選択した。また、プラスミド DNA の調整中に生じる塩基の変異を防ぐため、siRNA のセンス鎖に相当する配列中の C を T に塩基変異した。

siN107

5' -CACCGATGTAA TAT TAGTGTGTTT TAGAATTACATC  
AAGGGAGATAACAGCACTGATAGTTACATCTTTTTATGC-3

siN214

5' -CACCGATAGAAA TAG TGTGA TTTCT AGAATTACATC  
AAGGGAGATGAAGTCACAGCTGTTTCTATCTTTTTATGC-3

siP62

5' -CACCGCT TACTTGAG TACA TAGCT AGAATTACATC  
AAGGGAGATGCTGTGTTGCTCAAGTTGAGCTTTTTATGC

siN98

5' -CACCGAATATGAAAG TAGT TATAT AGAATTACATC  
AAGGGAGATTAGTGACTTGCTTTTCATATCTTTTTATGC-3

siN98-2

5' -CACCGTAGTTGT TTA TTAGATGATT AGAATTACATCAAGG  
GAGATATCATCTAAGTAGACAACACTTTTTATGC-3'

siluc

5' -CACCGTGCG TGT TGGTG TTA T CATCTCCCTTGAT  
GTAATCTAGGGTTGGCACCAGCAGCGCACTTTTTATGC-3

太字部分はターゲットとなる 21 塩基の配列、イタリックは安定した siRNA 発現のために挿入した塩基変異部位、下線部はループ構造 coding 領域を示す。siRNA 発現レンチウイルスベクターは、pCS-CDF-EG-PRE の EGFP DNA フラグメントを H-2K<sup>k</sup> DNA と AgeI と XhoI 部分にて入れ換えたことにより作製したレンチウイルスベクター DNA である、pCS-CDF-EG-H2K<sup>k</sup> の EcoRI 領域に siRNA 発現プラスミドを組み込み作製した。

DsRed 発現レンチウイルスベクター (pCS-CDF-CR-PRE) は pCS-CDF-CG-PRE の EGFP DNA フラグメントを DsRed DNA のそれと AgeI と XhoI 部分で入れ換えて作製した。

N 末端に HA-Tag を付加した Nup98 の発現プラスミド (p37R-HANup98) 及び、EGFP との融合蛋白質として vesicular stomatitis virus (VSV) (Indiana serotype, San Juan strain) Matrix (VSV M) 蛋白質を発現するプラスミド (pEGFPN3-M) は Dr. Elisa Izaurralde より分与された。

VSV M 蛋白質の 52~54 番目のアミノ酸 Asp-Thr-Tyr を Ala に置換したミュータント



VSV M(D) 発現プラスミドは Quickchange site-directed mutagenesis system (Stratagene) を用いて作製した。

哺乳細胞での Nup98 蛋白質の発現には、pcDNA3.1/Zeo(+) のマルチクローニングサイトに p37R-HANup98 の開始コドンから終始コドンを含む断片を組み込んだ pcDNup98 を用いた。

DsRed との融合蛋白質として大腸菌で組み換え蛋白質として発現させた NLS、UIA、rpL23a は、HeLa 細胞より抽出した mRNA から RT-PCR で増幅したそれぞれの DNA 断片を pDsRed1-N1 (CLONTECH) の Sall-BamHI 部分に組み込み後、さらにその Sall-NotI 断片を、pGEX-4T (Amersham) の Sall-Not I 領域に組み込み発現プラスミドとした。大腸菌 *E. coli* ER2566 株 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) で発現させた組み換え蛋白質は、glutathione sepharose 4 Fast Flow beads (Amersham) を用いて精製した。

#### 5) RT-PCR

遺伝子導入した 293T 及び HeLa 細胞から RNeasy RNA-preparation Kit (Qiagen) を用いて抽出した RNA を鋳型に、RT-PCR 反応は SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen) を用いて行った。目的の mRNA の増幅には以下のプライマーを用いた。

Nup107 ( 5' -AAACGCGGTAGCTAACTGCA-3' ,  
5' -ACCACCAGCTGACTTTGTGCA-3' ) 、

Nup214 ( 5' -CTTGCCACGAAAACCGTGA-3' ,  
5' -CAACCCGACGTCCTGAAAA-3' ) 、

p62 ( 5' -CAGACACCGACGGATTTGCTT-3' ,  
5' -TGGATGTTGTTGTGGAGGTGC-3' ) 、

Nup98 ( 5' -TCTCATCCCCAAAACAATGCCTT-3' ,  
5' -AAACAAAGATGCCTGTCCAGCA-3' ) 、

Nup98-2 ( 5' -TTATAAACTGACACCCCGCCC-3' ,  
5' -TTTAGCCCTTACCCACAGGT-3' ) 、

Nup153 ( 5' -TGACAATGAAGGCCAAAGTGT-3' ,  
5' -TAGGAGTTGTTCCAGAGCCAAA-3' ) 、

GAPDH の mRNA 増幅には、TaqMan GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) のプライマーを用いた。増幅反応は 50 ng の鋳型 RNA と 10 pmol のプライマーを用い 50  $\mu$ l で反応を行った。シングルバンドで、尚且つ PCR 反応の閾値を越えない、それぞれのアニーリング温度及びサイクル数等の条件をあらかじめ検討した後、アガロースゲルで電気泳動し、鋳型 RNA に含まれる目的の mRNA 量を測定した。

#### 6) ウイルスの調整

293T 細胞に pNL-EGFP をリン酸カルシウム法にて遺伝子導入した 3 日目の培養上清をフィルターでろ過したものをウイルス溶液として -80°C に保存した。培養上清中のウイルス量は、p24<sup>ant</sup> 抗原量を酵素免疫測定法にて測定し (ZetoMetrix Corp.)、10% ウシ胎児血清を含む RPMI-1640 で培養したヒト CD4<sup>+</sup> MT-2 細胞に対して感染を行った。

VSV-G 蛋白質をエンヴェロープとして持つ複製不可のウイルスベクターは、pCS-CDF-CG-PRE (EGFP 発現ベクター)、pCS-CDF-CR-PRE (DsRed 発現ベクター)、もしくは pCS-CDF-EG-H2K<sup>h</sup> (H2K<sup>h</sup>、siRNA 発現ベクター) を VSV の G 蛋白発現プラスミド (pVSV-G)、HIV-Gag-Pol 発現パッケージングプラスミド (pRRE)、Rev 発現プラスミド (pRSV-Rev) とともに 293T 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、3 日目の培養上清をフィルターでろ過し作製した。ウイルス力価は EGFP もしくは H-2K<sup>h</sup> を発現した感染細胞をフローサイトメトリーで測定し、決定した。感染実験には 10 mM MgCl<sub>2</sub> の存在下で DNaseI (20  $\mu$ g/ml) を室温、30 分処理し、プラスミド DNA を取り除いたものを使用した。また、65°C で 30 分処理したものを陰性コントロールとして使用した。

#### 7) 免疫染色

カバーガラス上で培養した HeLa 細胞を PBS で 2

回洗浄し、4% (vol/vol) paraformaldehydeを用い室温で15分間固定した。PBSで3回洗浄した後、温風乾燥した。次に0.2% Triton X-100/PBSで5分間処理して細胞膜を破壊し、5% BSA/0.1% Triton X/PBSにて1時間ブロッキングを行った後、核膜孔複合体を認識するマウスモノクローナル抗体 (mAb414) で4℃、一昼夜反応させた。0.05% Triton X/PBSで3回洗浄した後、Alexa594ラベルされた抗マウスIgGヤギ抗体 (Molecular Probes) で室温、1時間反応させ、0.05% Triton X/PBSで3回洗浄したものをLeica QFluoro systemで観察した。

#### 8) Nuclear import assay

カバーガラス上で培養したHeLa細胞を、氷上で冷却したPBSで洗い、50  $\mu$ g/ml Digitonin (SIGMA)/transport buffer buffer (20 mM HEPES-NaOH [pH 7.3], 110 mM CH<sub>3</sub>COOK, 2 mM (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg, 5 mM CH<sub>3</sub>COONa, 2 mM DTT) で氷上、5分処理し、細胞膜に穴を開ける。transport buffer で3回洗浄した後、energy-regenerating system (1mM ATP, 1mM GTP, 10mM creatine phosphate, 20U/ml creatine phosphokinase)、3  $\mu$ M DsRed 融合蛋白質 (DsRed-NLS, M9, U1A, rpL23a)、HeLa細胞の細胞質分画と30℃、30分反応させる。細胞をtransport buffer で3回洗浄後、氷上で30分間1% formalin/transport bufferで固定したものをLeica QFluoro systemにて観察した。

#### 9) Immunoblotting

Nup98 発現プラスミド (pcDNup98) と siRNA 発現プラスミドもしくはコントロールプラスミド (pUC19) を293T細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入した。3日後の細胞をPBSで2回洗浄した後、RIPA buffer (0.05M Tris-HCl pH 7.2, 0.15M NaCl, 0.1% SDS, 1% Deoxycholate, 1mM Phenyl methylsulfonyl fluoride) で細胞を融解した。煮沸後、遠心上清の蛋白質濃度を

測定し、蛋白質量が等しくなるようにSDS/PAGE sample buffer で希釈したものをSDS-PAGEにて泳動した。泳動後、PVDFメンブラン (Millipore corporation, Bedford, MA) に蛋白質をトランスファーし、一次抗体に goat anti-NUP98 (C-16) polyclonal antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California)、二次抗体に Biotin conjugated rabbit anti-goat IgG (CHEMICON) を反応させ、最後に Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (ZYMED) を反応させて検出した。

#### 10) 統計処理

2群の比較にはウェルチのt検定を行なった。P値が0.05以下のものについて統計学的に有意な差があるものとした。

#### (倫理面への配慮)

本研究においてはすべて樹立培養細胞を用いており、その使用にあたり細胞樹立者により倫理的配慮はなされている。実験動物は使用していない。

### C. 研究結果

#### 1) G1/S期の細胞へのHIV-1の感染

HIV-1もしくはHIV-1を基とするレンチウイルスベクターは、他のレトロウイルスとは異なり、静止期リンパ球やマクロファージに感染することができる。この現象は非分裂細胞において、核膜孔を通過し宿主クロマチンにウイルスゲノムをインテグレートさせることができるためであると考えられている。そこで、細胞周期を停止させ、核膜が存在する条件下において感染が十分に成立し、染色体へウイルスcDNAがインテグレートされているかどうかをReal-time PCR法を用いて検討した。

DNA polymerase  $\alpha$ の阻害剤であるaphidicolin (5  $\mu$ g/ml) で24時間処理したMT-2細胞を

PI で染色し、DNA 量をフローサイトメトリーで解析したところ、未処理のものに比べ S 期の細胞の割合は減少しており、G<sub>2</sub> 期の細胞はまったく検出されず、76.48%の細胞が G<sub>1</sub> 期で停止していることが確認された (Fig. 1A)。この条件下においてウイルスベクターを MOI 2 で感染させ、24 時間後の細胞内ウイルス cDNA 量を real-time PCR 法で定量した。この PCR では、細胞質におけるウイルス cDNA form である full-length、及び核内のウイルス cDNA である 2LTR circle、integrated form を、それぞれに特異的なプライマー、プローブを用いることで、それぞれのコピー数が定量可能であり (結果示さず)、つまり感染初期の細胞内におけるウイルス cDNA の状態のモニターが可能である。また、本実験に用いたウイルスベクターは env 遺伝子を持たず自己複製ができないため、子ウイルスの 2 次感染を無視できる。そのため感染初期段階のウイルス cDNA のみの検出が可能である。Fig. 1B は aphidicolin 存在下、非存在下における、ウイルス感染後 24 時間の培養細胞内に存在する integrated form、2LTR form、full-length/1 LTR circle form のコピー数を示した。その結果、分裂細胞に比べ少ないものの、細胞周期が停止した細胞においても十分な integrated form が検出された。また、aphidicolin 存在下、非存在下において full-length/1 LTR circle form と integrated form の存在比はそれぞれ  $10.8 \pm 2.4\%$  と  $9.0 \pm 1.1\%$ 、full-length/1 LTR circle form と 2LTR form の存在比はそれぞれ  $2.2 \pm 0.2\%$  と  $3.1 \pm 0.1\%$ 、と有意な差は見られなかった。この結果は aphidicolin 処理により G<sub>1</sub> 期で細胞周期が停止した状態でも HIV-1 は十分に感染を成立させることができるという、これまでの知見と一致しており、HIV-1 cDNA の核内移行は、MLV のような分裂期の消失時に行われる機構とは基本的に異なり、

核膜孔を通過することにより核内に侵入すること強く示唆する。

## 2) HIV cDNA の核内移行に必要な核膜孔複合体の検索

上述したように HIV-1 cDNA の核内移行が核膜存在下でも行われることから、HIV-1 cDNA の核内移行は核膜孔複合体を介することが示唆された。核膜孔複合体は約 50 種もの nucleoporin の集合体であり、核内と細胞質をつなぐ唯一の経路である。近年までの分子の核内ならびに核外移行の解析は、主に電子顕微鏡による nucleoporin の局在の解析や、特異的抗体を用いた免疫染色、及びマイクロインジェクション法を用いたカエルの卵細胞の解析などが主流であったが、siRNA 法が確立されて以来、核膜孔複合体の解析に応用され、今までの解析法では得られなかった新たな知見が得られてきている。

そこで、HIV-1 の感染に必要な役割を担う nucleoporin の検索に siRNA 法を導入した。nucleoporin の中でも、特に重要な役割を持つと考えられる Nup107、Nup214、p62、Nup98 の発現抑制を行ない、ウイルス感染に影響を及ぼす分子の検索を試みた。HIV-1 の感受性細胞である CD4<sup>+</sup> MT-2 細胞に高効率で siRNA を導入するにあたり、siRNA 発現ウイルスベクターを作製した。HIV-1 由来のウイルスベクターに、U6 プロモーターから siRNA を、Elongation factor から H-2K<sup>k</sup> を発現するユニットを並列に組み込むことにより、siRNA 導入細胞を H-2K<sup>k</sup> 発現により確認可能なウイルスベクターを作製した。Nup107、Nup214、p62、Nup98 に対する siRNA (siN107、siN214、sip62、siN98、siN98-2) 発現ウイルスベクターを MOI 3 ~ 5 で MT-2 に感染させ、4 日後の mRNA 発現量を RT-PCR により確認したところ、siN107、siN214、siN98、siN98-2 導入細胞において明らかな

mRNA 発現抑制が確認されたが、sip62 導入細胞ではその抑制効率はわずかであった (Fig. 2A)。この条件下において EGFP 発現ウイルスベクターを感染させ、Nucleoporin 発現抑制条件下におけるウイルス感染効率を FACS により解析した。Fig. 2B に EGFP 発現ウイルスベクター感染 3 日後の、H-2K<sup>b</sup> 発現細胞における GFP 発現細胞の割合を示した。Nup107、Nup214 発現抑制細胞において軽度の感染阻害効果が確認され (88.7%、91.3%)、また、その分子の mRNA 発現抑制効率が最も低かった p62 においては、ウイルス感染抑制効果はほとんど確認されなかった (95.2%)。一方、ふたつの siRNA の標的配列によりその抑制効果は異なっているながらも、いずれの Nup98 発現抑制細胞においても明らかな HIV-1 感染の抑制効果が確認された (78.1%、84.5%)。さらに、これらそれぞれの Nucleoporin に対する siRNA 発現ウイルスベクターの感染価を MOI 10 にて行っても、同様なウイルス感染抑制効果が確認された。

3) siRNA を用いた核膜孔複合体形成の阻害  
以上のスクリーニングにおいて最も強い HIV-1 感染抑制効果が見られた Nup98 は、これまで mRNA の核外輸送とともに Importin  $\beta$ 2 を介する蛋白質の核内移行に関与する分子として知られている。また、核膜孔複合体は数種のサブコンプレックスが集合して構成されており、その中で特に Nup107 などの細胞周期 M 期終了後の核膜孔複合体再構築過程において中心的役割を有する nucleoporin の発現を阻害することにより、核膜孔複合体の構築が不完全となるのが最近の研究で明らかとなっているが、Nup98 もまた核膜孔複合体再構築に関与する主要な分子であるという報告もされている。このように Nup98 は核膜孔複合体の再構築ならびに核内および核外輸送に関与する分子である。そこで、siRNA にて Nup98 発現抑制

させた細胞の核膜について詳細に解析を行った。最も強力な抑制効率を有する Nup98 に対する siRNA 発現 DNA (siN98) を 293T 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、72 時間後の mRNA 発現量を RT-PCR により確認した (Fig. 3A)。siN98 導入細胞において p62、Nup107、Nup153、Nup214 の mRNA 発現量に変化は見られなかったが、Nup98 と同程度の Nup96-mRNA の発現抑制が見られた。この結果は、Nup96 が Nup98 と同じ mRNA から前駆体が翻訳された後に、蛋白質分解酵素により Nup98 と Nup96 切断されるからである。このように siN98 による特異な mRNA 発現抑制が確認された。siN98 の mRNA 発現抑制効果は、siN98 導入後 2 日目に観察され、4 日目に抑制効果のピークがみられた。そこで、siN98 導入後 4 日目における Nup98 蛋白質の発現を Western blot により確認した (Fig. 3B)。siN98 と Nup98 発現プラスミドを共導入した細胞において Nup98 発現ベクターからの Nup98 蛋白質の発現抑制が確認され (レーン 1, 2, 3, 4)、またそれら細胞における Nup98 蛋白質の発現量は内在性 Nup98 蛋白質のそれより低下していた (レーン 2, 3, 4, 6)。つまり、siN98 導入により強制発現および内在性の Nup98 蛋白質の発現抑制が確認された。さらに、siN98 導入細胞の核膜孔複合体の状態を、核膜孔複合体に対する特異的抗体である mAb414 を用いた Western blot 及び免疫染色により解析した (Fig. 3C-a, b)。この mAb414 は FG リピードメインに対する抗体であり、Nucleoporin の中でも主に p62 に、また、それより反応性は低いながら Nup153、Nup214、Nup358 に結合する抗体である。Nup107 の発現抑制により核膜孔複合体の形成を阻害すると、mRNA の発現量が変わらなくとも Nup214 や Nup153 といった他の nucleoporin 蛋白質の発現量が減少するという報告がなされている。これと同じように、siN98 導入細胞において核膜孔構成蛋白質の