

Nucleoporin 蛋白質の発現が抑制されているかどうかを、mAb414を用いたWestern blotにより確認した (Fig. 3C-a)。siN98 導入細胞において mRNA の発現量は変化していないにもかかわらず (Fig. 3A)、mAb414 に反応する Nup214 及び Nup358 蛋白質の発現が抑制されていた。また、トランスフェクション法にて siN98 発現プラスミドを導入後、72時間の HeLa 細胞を mAb414 にて染色したところ、コントロールにくらべ核膜縁のシグナルが明らかに弱く (青矢印)、また細胞質に強い顆粒状のシグナル (白矢印) が検出されるようになった (Fig. 3C-b)。これは Nup98 ノックアウトマウスの細胞において、核膜孔複合体の構築が一部阻害され、いくつかの nucleoporin は細胞質の Annulate Lamellae に蓄積するという報告と類似する結果であった。次に大腸菌にて DsRed 標識した NLS、U1A、rpl23a 蛋白質を作製し in vitro nuclear import assay にて、Nup98 発現抑制細胞核膜の核内輸送機能を検討した (Fig. 3D, 3E)。DsRed 標識した NLS、U1A、rpl23a を用いて in vitro nuclear import assay を行い、その細胞を固定後、Leica Qfluoro System にて観察した (Fig. 3D)。また、ランダムな5視野における核内シグナル陽性細胞の割合を示した (Fig. 3E)。その際、細胞により核内シグナルに強弱が見られた。そこで陽性細胞のカウントを正確に行うために、Leica Qfluoro によるシグナルの取り込み時間を2秒に統一して、その後バックグラウンドが消えるまでコントラストを上げることにより、陽性、陰性を明確にしてカウントした。受動拡散による核内移行を行う U1A 蛋白質の核内移行は、コントロールの luciferase-siRNA 導入細胞において  $60.8 \pm 14.8\%$ 、Nup98-siRNA 発現細胞では  $58.4 \pm 8.7\%$  とその差はみられなかった。これは核膜孔複合体が存在することを強く示唆する。また、

importin  $\beta$ 、transportin (importin  $\beta 2$ )、importin  $\beta 3$ 、importin7 の4種類の輸送担体蛋白質と直接結合し、いずれかの核内輸送経路にて核内へ移行する rpl23a 蛋白質の核内移行も、luciferase-siRNA 導入細胞において  $54.7 \pm 10.7\%$ 、Nup98-siRNA 導入細胞では  $58.5 \pm 11.5\%$  とその差はみられなかったが、importin  $\alpha/\beta$  の経路にて核内に移行する NLS の核内移行能は Nup98-siRNA 導入により  $87.5 \pm 7.6\%$  から  $71.6 \pm 11.0\%$  と有意に低下した (Fig. 3E)。このことから Nup98 の siRNA 導入により、核膜孔複合体のすべての構造が破壊されたのではなく、一部の nucleoporin の構造を機能特異的に阻害されていることが示された。

4) Nup98 発現抑制細胞への HIV-1 の感染性  
次に、siN98 の導入により核膜孔複合体が部分的に機能欠損に至った細胞における HIV-1 cDNA の核内移行能を Real-time PCR 法にて検討した。siRNA 発現プラスミドをリン酸カルシウム法にてトランスフェクション後72時間の 293T 細胞に、レトロウイルスベクターを約 MOI 0.5 で感染させ、さらに24時間後に DNA を抽出し、HIV-1 cDNA 量を Real-time PCR にて定量した。siN98 発現細胞における full-length DNA 量は、コントロールの luciferase-siRNA (siLuc) 発現細胞との間に有意な差が見られなかった (Fig. 4A、 $1 \times 10^6$  細胞あたりそれぞれ  $619047 \pm 71648$  copies と  $661023 \pm 121470$  copies、ウェルチの t 検定  $P > 0.05$ ) が、integrated form と 2LTR form の形成には有意な抑制効果が見られた (integrated form:  $1 \times 10^6$  細胞あたりそれぞれ  $35181 \pm 5524$  copies と  $75832 \pm 17646$  copies、ウェルチの t 検定  $P < 0.05$ ; 2LTR form:  $1 \times 10^6$  細胞あたりそれぞれ  $36938 \pm 6621$  copies と  $52740 \pm 7761$  copies、スチューデントの t 検定  $P < 0.05$ )。また、full-length DNA/1LTR と

integrated form 及び 2LTR form の存在比は siN98 発現細胞で  $11.6 \pm 0.7\%$ 、siLuc 発現細胞で  $19.6 \pm 2.5\%$  と、Nup98 発現抑制細胞では、HIV-1 cDNA の核内移行が抑制されていた。

次に、実際に複製可能な HIV-1 感染において、Nup98 が重要な働きを担っているかどうかを検討した。siRNA 発現レンチウイルスベクター感染後 3 日目の MT-2 細胞へ EGFP を発現する複製可能な HIV-1 を MOI 0.2 にて感染させた。HIV-1 感染後 3 日目において、EGFP を発現した発現細胞 (=ウイルス感染細胞) は、コントロールの siLuc 導入 MT-2 で 56.3%であったのに対し、siN98 導入 MT-2 細胞では 32.8%であった (Fig. 4B)。蛍光顕微鏡でも EGFP 発現抑制が観察された。(Fig. 4C)。また、感染後 3 日後と 7 日後の p24 発現量も siLuc 導入細胞に比べ 1/4 ~ 1/10 程度に減少した。

#### 5) Nup98 の機能を特異的に阻害する VSV-M 蛋白質による HIV-1 の感染阻害

siRNA 導入 Nup98 発現抑制により HIV-1 の感染が抑制されたが、この siN98 導入細胞においては、Fig. 3A に見られるように Nup96 RNA 分子の発現の抑制もみられる。Nup96 は Nuol07 サブコンプレックスの構成蛋白のひとつでもあり、Nup98 が直接関与する核内移行抑制による感染阻害であるのか、Nup98 並びに Nup96 の発現抑制に付随する核膜孔複合体再構築の阻害による二次的な阻害(他の Nup が核膜孔複合体に集合できなかったため)であるのか明らかにする必要がある。そこで、Nup98 が HIV-1 cDNA の核内移行に直接関与するかどうかを確認するため、Nup98 の特異的な阻害作用を有する VSV-M 蛋白質を用いた実験を行った。VSV-M 蛋白質は Nup98 の 66-515 アミノ酸部位の FG-repeat ドメインに結合することにより、hRAE1/Gle2 や TAP、CRM1 といった輸送担体との結合を阻害し、蛋白質の核内移行、並びに

mRNA の核外移行を特異的に阻害する分子として報告されている。一方、VSV-M 蛋白質の抑制効果は 52-54 アミノ酸をアラニンに置換した変異蛋白質 M(D) において見られない。そこで、野生型 VSV-M 蛋白質発現プラスミド DNA 及び変異型 VSV-M(D) 蛋白質発現プラスミド DNA を導入した 293T 細胞へウイルスベクターを感染させ、24 時間後のウイルス cDNA 量を Real-Time PCR 法にて定量し、その HIV-1 cDNA の核内移行阻害効果を検討した。Nup98-siRNA 発現細胞の結果と同様、VSV-M 発現細胞において full-length DNA の形成はコントロールとその差は見られなかった (Fig. 5A、 $1 \times 10^6$  細胞あたり pUC:  $1996211 \pm 600128$  copies と M:  $2368567 \pm 221759$  copies) が、integrated form と 2LTR form の形成には有意な抑制効果が見られた ( $1 \times 10^6$  細胞あたり integrated、pUC:  $136217 \pm 37708$  copies と M:  $56128 \pm 8144$  copies; 2LTR、pUC:  $206444 \pm 23076$  copies と M:  $147559 \pm 5423$  copies)。この抑制効果は変異蛋白質の VSV-M(D) 発現細胞では確認されなかった。また、本実験で用いた VSV-M 蛋白質は EGFP との融合蛋白質として発現するため、VSV-M 発現細胞に DsRed 発現 HIV ベクターを感染させ、VSV-M 蛋白質発現細胞における HIV-1 の感染阻害効果を FACS により解析したところ、VSV-M 発現細胞においてウイルス感染の抑制がみられた (Fig. 5B、GFP<sup>+</sup>、DsRed<sup>+</sup>細胞、M: 3.9% と M(D) : 20.9%)。以上の結果より、Nup98 が直接 HIV cDNA の核内移行に関与していることが示された。

以上の結果は Nup98 が HIV cDNA の核内移行にきわめて重要な働きを担っていることを示すものである。

#### D. 考察

HIV-1 はその発見から精力的に研究され、その複製機構の概要が明らかになってきているが、

AIDS 患者が世界的に増え続けている現在、その広がり終止符を打つに至るまでの知見は得られていない。現在の薬剤はウイルスレセプターや逆転写をターゲットとするのが AIDS 治療の主体となっているが、HIV-1 感染の機構の中でも核内移行のメカニズムの解明は、AIDS 治療に多大に貢献する分野であると考えられる。

HIVをはじめとするレトロウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスなどは核内で自己ゲノムの複製を行うため、ウイルスゲノムを核内に輸送する。このウイルスゲノムの核内移行メカニズムの解明は、ウイルス感染の制御、及び、新たな治療方法の開発に発展するものとして、近年様々なメカニズムが明らかになりつつある。中でもアデノウイルスの核内移行経路の解明は大きく注目されている。アデノウイルスは細胞内に侵入後、核膜孔複合体の細胞質側に位置する CAN/Nup214 にウイルスカプシドを結合させる。次いでヒストン H1 がカプシドを形成するヘキソンに結合し、ヘキソンはヒストン H1 蛋白質とともに Importin7、Importin  $\beta$  により核内に輸送されるため、カプシドが崩壊する。その結果、ウイルス DNA を核内に放出させると報告されている。この論文はウイルス感染過程に核膜孔複合体の関与が明らかになった報告であり話題となった。

HIV に関してもごく最近、HIV cDNA の核内移行にヒストン H1 や、rpL23a の輸送担体として知られる importin7 が関与するという報告がされた。この論文では、PIC を構成する蛋白質を単独に解析したのではなく、PIC そのものを抽出して解析しているため非常に興味深い結果であり信憑性があると考えられる。

我々の結果によると siRNA を用い Nup98 の発現を抑制した細胞において NLS の核内移行経路は部分的に欠損したが、U1A、rpL23a の核内移

行経路は正常であり (Fig. 3D, E)、この細胞において HIV cDNA の核内移行の抑制が確認された (Fig. 4A)。rpL23a は importin7 の経路を利用し核内に輸送されるが、その他にも importin  $\beta$ 、importin  $\beta$ 2、importin  $\beta$ 3 の経路でも核内に輸送されるので矛盾はない。Nup98 ノックアウトマウス細胞では、importin  $\beta$ 3 の経路は阻害されないと報告されているし、また、Nup98 ノックアウト細胞において、p62 や Nup214 などの Nucleoporin は細胞質の Annulate Lamellae に凝集し、核膜孔複合体の再構築が部分的に抑制され、さらにそれに加え、importin  $\alpha$ 、importin  $\beta$ 、importin  $\beta$ 2、importin7、CRM1 といった輸送担体もまた核膜ではなく Annulate Lamellae へ凝集し、蛋白質輸送に影響を及ぼすと報告されている。そのため、Nup98 抑制細胞において rpL23a の輸送が抑制されていなくとも、HIV cDNA の核内移行に importin7 が関与するという報告との間に矛盾はない。また、Fig. 3C に示すように、siRNA で Nup98 の発現抑制をした細胞においても Nup98 ノックアウトマウスと同様にシグナルの凝集が見られた。この凝集の程度は低いですが、これは siRNA の抑制効率に由来すると考えられ、siRNA により Nup98 が発現抑制された細胞においても、この核輸送経路が部分的に崩壊していることが示唆される。この siRNA の影響を受けた核輸送経路に HIV cDNA の核内輸送経路が含まれていると予測され、このことから HIV cDNA の核内移行に importin7 が関与していることが示唆される。

siRNA で Nup98 の発現を抑制した細胞においては Nup96 の影響も考えられるため、Nup98 の特異的インヒビターとして VSV-M 蛋白質を用いた解析を行った。Nup98 は importin  $\beta$ 2 を介する核内移行に関与し、また、importin  $\beta$ 、importin  $\beta$ 3 とも FG-repeat ドメインにて結合することが知られているが、その他にも mRNA

の核外輸送に関与し、そのインヒビターとして VSV-M は発見された。Nup98 は FG-repeat ドメインにて、先の importin の他に、hRAE1/Gle2 や TAP, CRM1 といった核外移行に関与する輸送担体と結合することが知られている。VSV-M は Nup98 の FG-repeat ドメインに特異的に結合し、他の輸送担体の結合を阻害するのである。Fig. 5A に示すように、VSV-M を導入した細胞において HIV cDNA の核内移行の抑制が観察された。これは HIV cDNA は Nup98 が関与する核内輸送経路を利用していることをさらに強く示唆する結果である。しかし、VSV-M をトランスフェクションにて導入した細胞においては mRNA の核外輸送のほかに核内輸送の阻害もみられるが、カエル卵細胞にインジェクションにて VSV-M 蛋白質を導入した細胞においては mRNA の核外輸送のみが阻害され、核内輸送の阻害は確認されない。この差は導入後の時間に関係しており、トランスフェクションにて導入した細胞においては発現誘導までおよそ 2-3 日が必要であり、その間に既に核外輸送が阻害されており、その結果、核内輸送担体が核内に蓄積してしまうという 2 次的作用が原因ではないかと考察している。我々の結果もこの核外輸送の経路が抑制されたため、その 2 次的作用として HIV cDNA の核内輸送が阻害された可能性も考えられる。しかし、Leptomycin B (LMB) 処理した細胞の integrated form は濃度依存的に減少したが、同時に 2LTR form は増加し、結果として核内へ移行した HIV cDNA には差は見られなかった (結果示さず)。この結果は、CRM1 の核外移行を阻害した条件においても HIV-1 cDNA の核内移行は抑制されないことと考えられる。つまり、CRM1 により核外移行される分子は HIV cDNA の核内移行には関与していないことをしめす。また、CRM1 処理により integrated form は減少したが、これは CRM1 により核外移行されるべき分子の核内への蓄

積により、HIV cDNA の integration が阻害されたことを示す。Nup98 は FG-repeat 領域で CRM1 と結合し、核外移行に関与するとも言われている。実際 HIV の Rev 蛋白質は NES 配列を持ち、CRM1 と複合体を形成し、スプライスされないウイルスゲノム RNA を核外に輸送するが、この過程に Nup98 が関わっていると言われている。そのため Nup98 の機能阻害の結果、CRM1 の核外移行も阻害されたと考えられるが、LMB 処理細胞とは異なり、Nup98 の機能が阻害された細胞では 2LTR の増加ではなく減少の傾向が見られた (結果示さず)。このことから、インテグレーションではなくむしろ核内移行が阻害されたことが考えられ、Nup98 を介した HIV cDNA の核内移行メカニズムの存在が強く示唆される。Nup98 が importin7 の輸送経路に関与している可能性も考えられる。importin7 の抑制だけでは完全に HIV cDNA の核内輸送を阻害することはできないため、そのほかの分子群による核内輸送系とともに Nup98 を介する核内輸送系が関与している可能性も考えられる。

これまでの解析から、核輸送の方向性は基本的に RanGDP と RanGTP の存在密度に関係していることは明らかになっている。細胞質においては RanGDP が多く存在し、核内においては RanGTP が多く存在する。RanGTP はカーゴ分子 (NES) / 輸送担体 (CRM1 など) と共に複合体を形成し細胞質側の Nucleoporin (CAN/Nup214 という報告がある) に到達すると RanBP1 の働きにより RanGTP は RanGDP へと変換されカーゴ分子 (NES) は細胞質に放出される。同じく RanGDP は核内輸送されるカーゴ分子 (NLS) / 輸送担体 (importin  $\beta$ ) と共に複合体を形成し、核膜孔複合体を通過し、核内部の Nucleoporin (importin  $\beta$  を介するものでは Nup153、importin  $\beta$  2 を介するものでは Nup98 という報告がある) に結合する。そこで RCC1 の働きに

より RanGDP は RanGTP へと変換されるとカーゴ分子 (NLS) は核内に放出されるのである。Nup98 はこの RanGDP/GTP 変換の際、複合体が最後に結合する足場となるという報告もされており、HIV cDNA の核内移行の際にも Nup98 が核内への放出に関係しているのかもしれない。

また、蛋白質が核膜孔複合体を通過する際のモデルとして、現在もっとも信じられているのは「affinity gradient」モデルである。核膜孔複合体が約 50 種類の Nucleoporin から構成されていることは既に述べた。これら Nucleoporin はそれぞれの FG 及び FXFG repeat で輸送担体の importin と結合するが、それぞれの Nucleoporin と importin の親和性が異なっているのである。例えば importin  $\beta$  の核内移行の場合、その親和性が Nup358 < p62 < Nup153 となっており、その親和性の勾配により、importin  $\beta$  は Nup358  $\rightarrow$  p62  $\rightarrow$  Nup153 と連続的に結合していくことで核内移行するという報告もある。HIV cDNA の核内移行の際、Nup98 が親和性勾配の経路のひとつである可能性も考えられる。

#### E. 結論

HIV が新たな個体に感染する際のターゲットとしてマクロファージ及び静止期 CD4<sup>+</sup>T リンパ球を挙げることができる。HIV はこれらの細胞に侵入後宿主クロマチンにインテグレートするまでの間に核膜孔複合体を通過すると考えた。本研究ではその核膜孔複合体の構成蛋白質の中から Nup98 が HIV cDNA の核内移行に関与することを見出した。この分子を siRNA により発現抑制することにより HIV cDNA の核内移行を阻害することができた。Nup98 を介した感染メカニズムの更なる解明は、新たな AIDS 治療法の開発に大いに貢献するものと思われる。

#### F. 健康危険情報

HIV 増殖の抑制により、エイズ患者の発症、特に潜伏感染の抑制に寄与する情報である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Miura Y, Koyanagi Y, Mizusawa H. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces neuronal apoptosis in HIV-encephalopathy. *J. Med. Dental Sci.* 50: 17-25, 2003.
2. Miura Y, Misawa N, Kawano Y, Okada H, Inagaki Y, Yamamoto N, Ito M, Yagita H, Okumura K, Mizusawa H, Koyanagi Y. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV central nervous system infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 2777-2782, 2003.
3. Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, Tanaka R, Hirose K, Bannai K, Edamatsu T, Yanaka M, Niitani Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H, Koyanagi Y, Yamamoto N. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 4185-4190, 2003.
4. Sato Y, Terada Y, Utsunomiya H, Koyanagi Y, Ito M, Miyoshi I, Suzuki T, Sasano H, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in human follicle following xenotransplantation of the human ovarian cortex into NOD-SCID mice. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 67-72, 2003.
5. Zahidunnai D M, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N.

Rapid tumor formation of hman T-cell leukemia virus type 1-infected cell line in novel NOD/SCID/ gammac (null) mice • (NOG) mice: Suppression by an inhibitor against NF-kappaB. *J. Virol.* 77: 5286-5294, 2003.

6. Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Takahashi Y, Koyanagi Y, Nakamura M, Ito M, Yamamoto N, Tanaka. Induction of protective immune responses against R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intrasplenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4(+) T-cell origin. *J. Virol.* 77: 8719-8728, 2003.

7. Suzuki Y, Misawa N, Sato C, Ebina H, Masuda T, Yamamoto N, Koyanagi Y. Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: Integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virus Genes*, 27:177-188, 2003.

8. Baba S, Takahashi KI, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H, Gorelick RJ, Kawai G. Role of the zinc fingers of HIV-1 nucleocapsid protein in maturation of genomic RNA *J Biochem*, in press.

## 2. 学会発表

1. Koyanagi Y, Kawano Y, Tanaka Y., CXCR4 is a critical molecule for dissemination of HTLV-I leukemic cells in vivo. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2003.

2. Miura Y, Koyanagi Y, Mizusawa H. Detection of a death inducing ligand in brain of HIV encephalopathy patients and induction of neuronal apoptosis in vitro and in vivo HIV infection model. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2003.

3. 小柳義夫. レトロウイルスによる脳神経組織障害のメカニズム. 日本神経免疫学会、長崎、2003.

4. 蝦名博貴、青木淳、小柳義夫. Nucleoporin 依存性 HIV 感染のメカニズム. 第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003.

5. 青木淳、小柳義夫. 抑制性 RNA 発現レンチウイルスベクターの開発. 第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003.

6. 青木淳、小柳義夫. HIV感染へのRNAi発現レンチウイルスベクターの開発. 第26回日本分子生物学会、神戸、2003.

7. 河野祐治、小柳義夫. A lentivirus-based expression cloning system for human T cells. 第26回日本分子生物学会、神戸、2003.

## II. 知的所有権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得状況

なし

2. 実用新案登録

なし

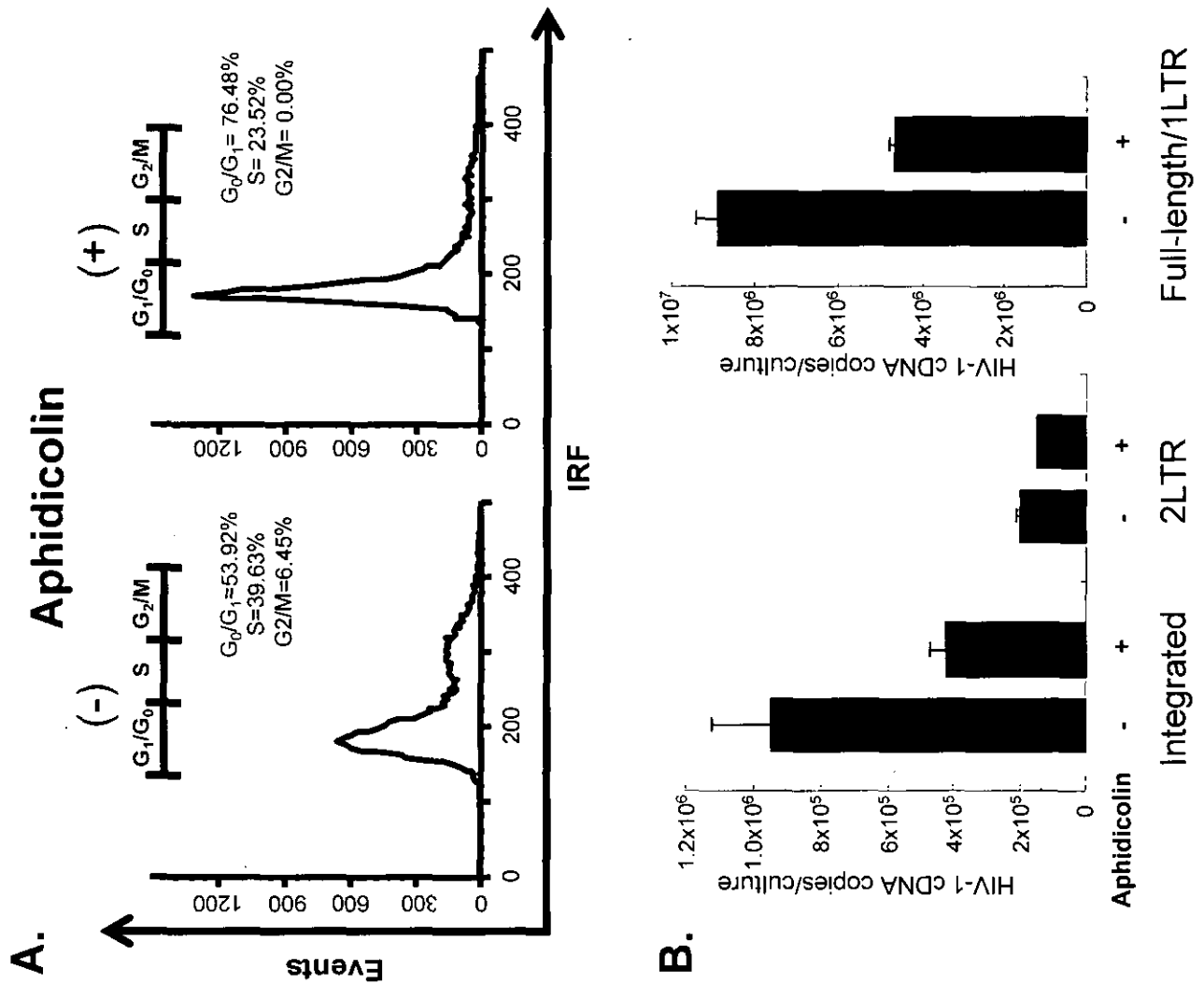
3. その他

なし

**Fig. 1.**  
G1期停止細胞におけるHIV cDNAの核内移行効率。

(A) aphidocolin処理した細胞の解析。Aphidocolinを含む(+)培地もしくは含まない培地(-)で24時間培養したMT-2細胞をpropidium iodide (PI)でDNAを染色し、flow cytometryにて細胞内DNA含有量を解析した。

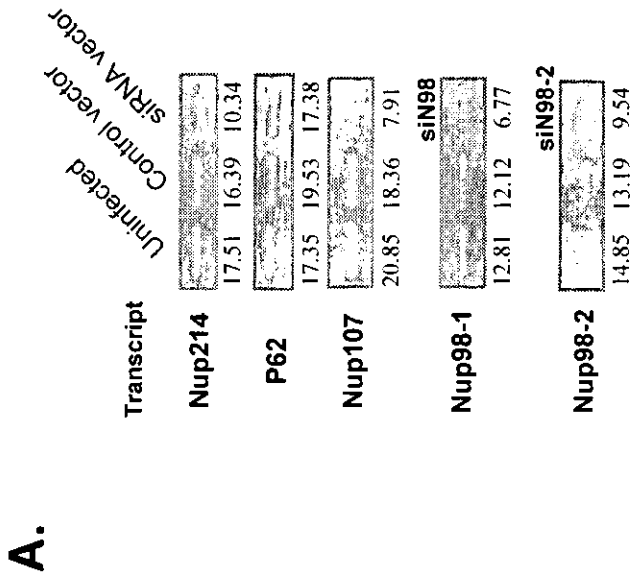
(B) HIVベクターを感染させたAphidocolin処理及び未処理細胞中のHIV cDNAの定量。HIVベクター感染後24時間の培養細胞中に含まれるウイルスDNAコピー数を示す。Aphidocolin処理及び未処理の細胞にHIVベクターを感染させ、Aphidocolinを含む(+)培地もしくは含まない培地(-)で24時間培養後、DNAを回収し、Real-time PCRによりウイルスDNAコピー数を定量した。



**Fig. 2.**

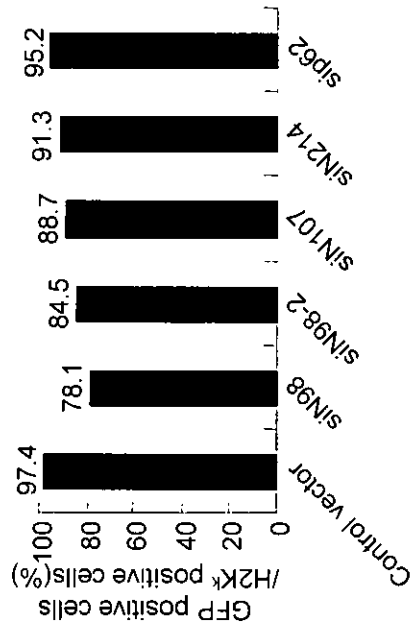
siRNA法によるnucleoporin発現抑制とHIV感染に与える影響。

(A) siRNA発現ウイルスベクターを導入したT細胞におけるnucleoporin mRNA発現量。Nup214 (3694-3714)、p62 (660-680)、Nup107 (470-490)、Nup98 (579-589、2344-2364)に対するsiRNA発現レンチウイルスベクターをMOI 5にて感染させたMT-2細胞における、mRNA発現量を示す。陰性コントロールとしてH2K<sup>k</sup>のみ発現するウイルスベクターを用いた。ウイルスベクター感染4日目の細胞からmRNAを回収し、RT-PCRにて解析した。下に示す数字はNIH imageにてバンドの濃度を数値化したものである。



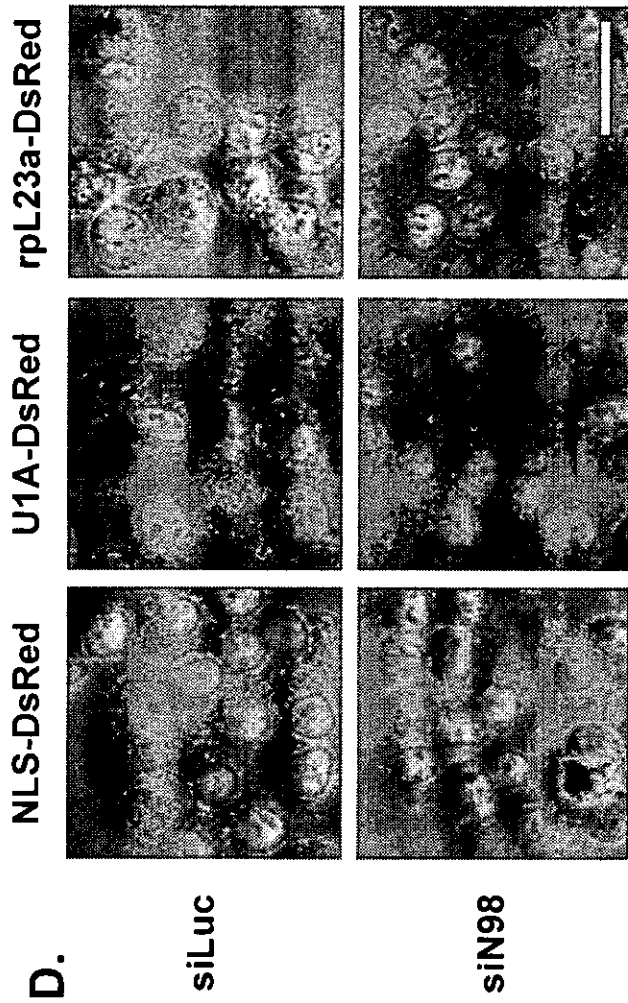
**B.**

(B) siRNA発現ウイルスベクターによりnucleoporinの発現を抑制したT細胞へのHIVベクターの感染性。Nucleoporinに対するsiRNA発現レンチウイルスベクターを感染後4日目のMT-2細胞に、GFP発現HIVベクターを感染させ、さらに3日後の細胞をFACSで解析した。H-2K<sup>k</sup>細胞(siRNA導入細胞)のうち、GFP<sup>+</sup>細胞(HIVベクター感染細胞)の割合を示している。





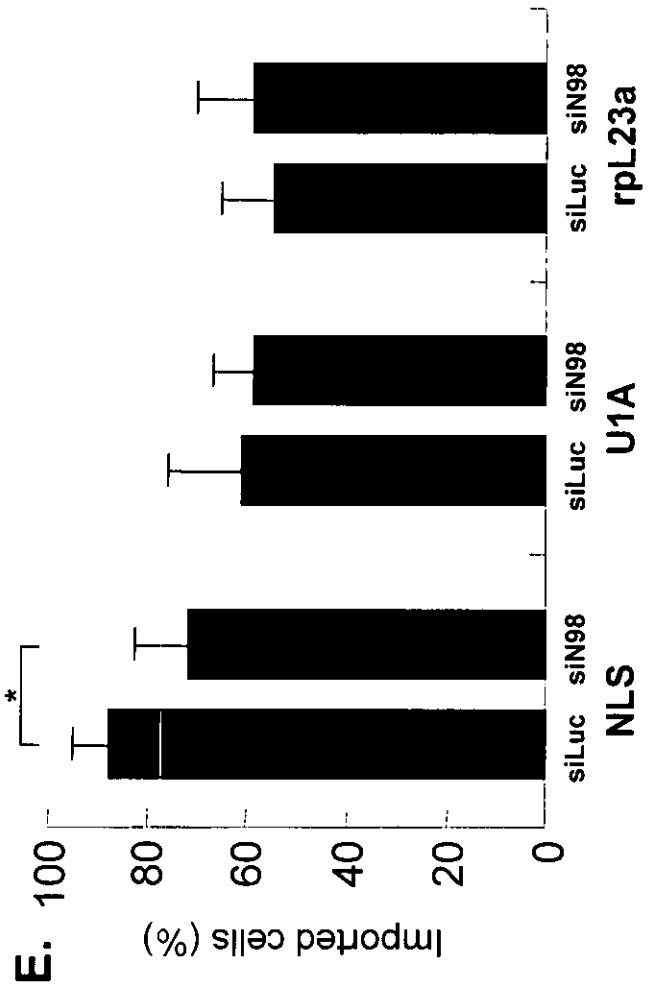




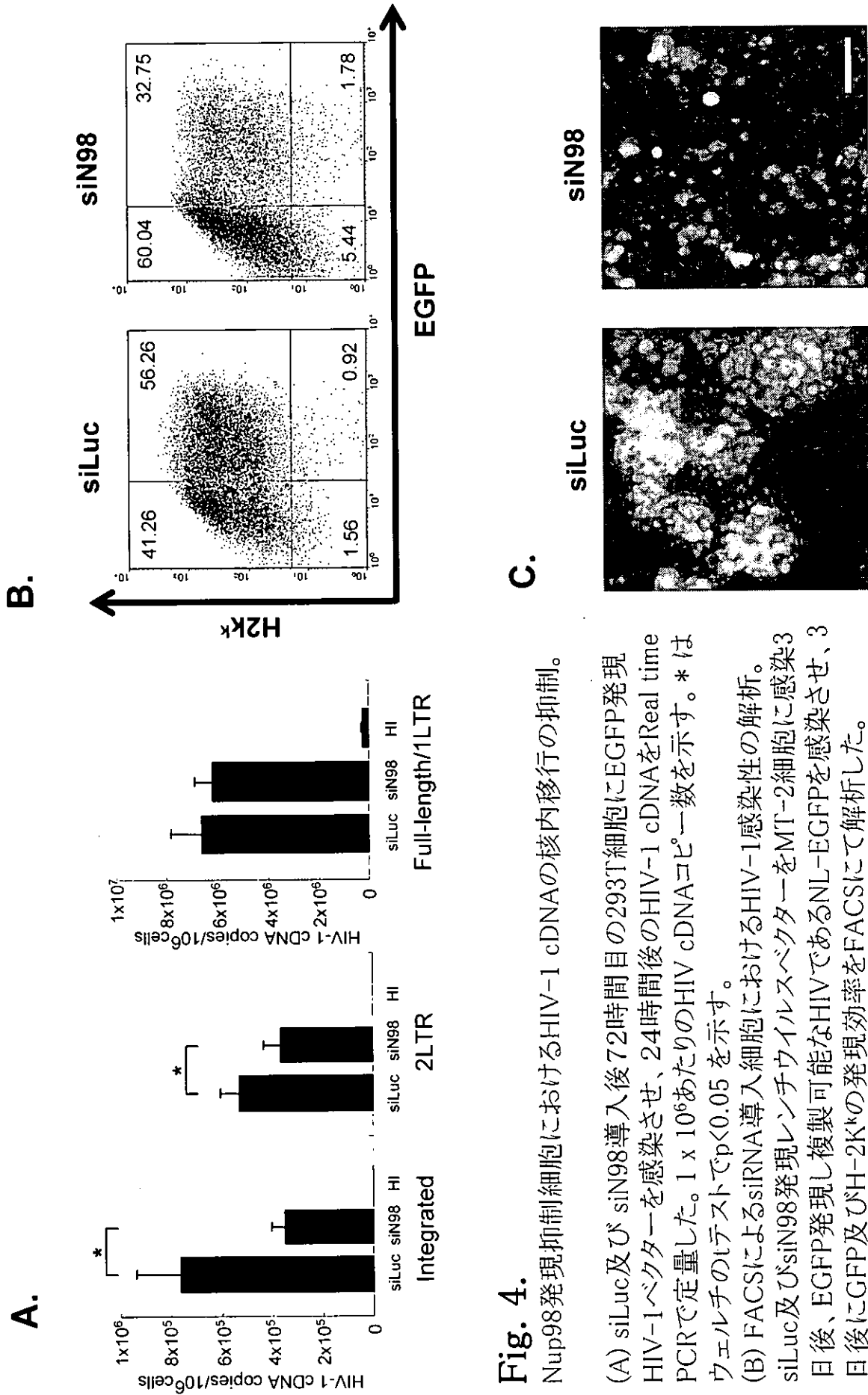
**Fig. 3.**

Nup98発現抑制細胞における核膜孔複合体の部分的機能欠損。

(D) Nup98を発現抑制させたHeLa細胞を用いた*in vitro* Nuclear import assay。siLuc及びsiN98発現レンチウイルスベクター感染後3日目のHeLa細胞をdigitonin処理し、DsRedと融合蛋白質として作製したNLS、U1A、rpl23aの*in vitro* Nuclear import assayを行った。NLS-DsRedはimportin- $\alpha/\beta$ 、rpl23a-DsRedはimportin- $\beta$  3、U1A-DsRedは濃度拡散による核内輸送経路のモデルとして用いた。スケールバーは30  $\mu$  m。



(E) *in vitro* Nuclear import assayの定量解析。ランダムに選択した5視野の細胞を数え、核内にDsRedが輸送された細胞の割合を示した。\*はウェルチのtテストで $p < 0.05$ を示す。



**Fig. 4.** Nup98発現抑制細胞におけるHIV-1 cDNAの核内移行の抑制。

(A) siLuc及び siN98導入後72時間目の293T細胞にEGFP発現 HIV-1ベクターを感染させ、24時間後のHIV-1 cDNAをReal time PCRで定量した。1 x 10<sup>6</sup>あたりのHIV cDNAコピー数を示す。\*は ウェルチのtテストでp<0.05を示す。

(B) FACSによるsiRNA導入細胞におけるHIV-1感染性の解析。 siLuc及びsiN98発現レンチウイルスベクターをMT-2細胞に感染3日後、EGFP発現し複製可能なHIVであるNL-EGFPを感染させ、3日後にGFP及びH-2K<sup>k</sup>の発現効率をFACSにて解析した。

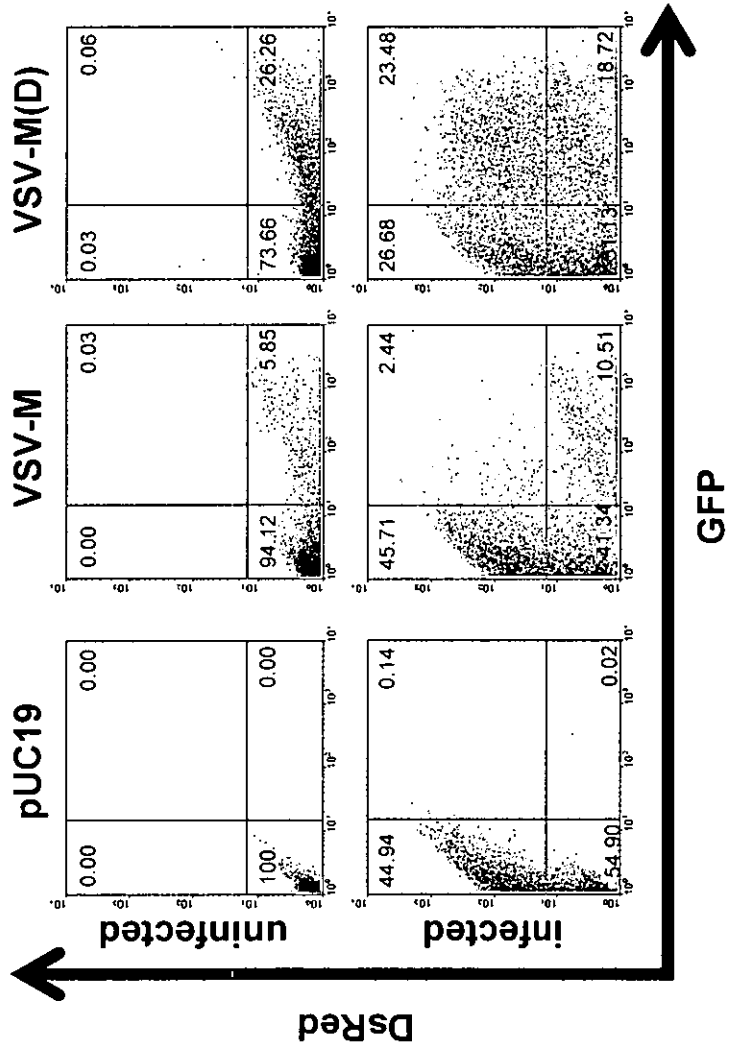
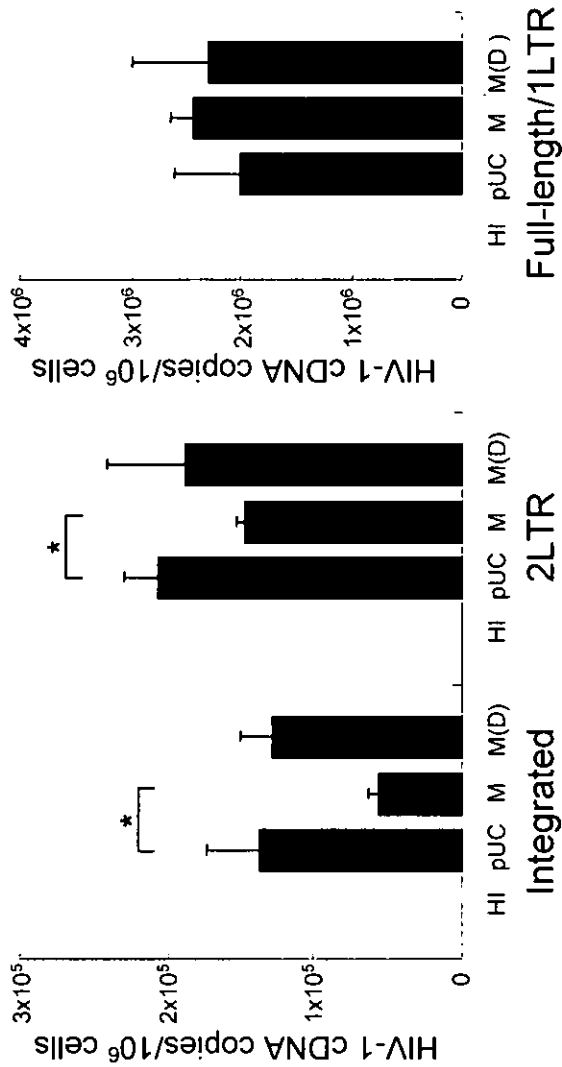
(C) (B)の蛍光顕微鏡による観察。スケールバーは100 μm。

**Fig. 5.**

Nup98機能阻害によるHIV-1感染阻害。

(A) VSV-Mおよびその変異体M(D)発現プラスミドDNAをトランスフェクション後、12時間目の293T細胞にDsRed発現HIV-1ベクターを感染させ、さらに24時間後のDNAを回収し、HIV-1 cDNAをReal time PCRで定量した。\*はウェルチのtテストで $p < 0.05$ を示す。

(B) (A)の細胞におけるDsRed及びH-2K<sup>k</sup>の発現効率をFACSにて解析した。



平成15年度研究報告書  
厚生労働省科学研究費補助金(エイズ対策研究事業)  
(分担)研究報告書

HIV-1 受容体アンタゴニストおよび樹状細胞免疫賦活を用いた HIV-1 増殖制御法に関する研究：  
ヒトキメラマウス(hu-PBL-SCID)個体での評価

分担研究者 田中勇悦

琉球大学大学院医学研究科免疫学分野 教授

研究要旨

人における HIV-1 感染を再現する動物モデルとして、ヒトキメラマウス (hu-PBL-SCID) 個体を用いて、HIV-1 受容体 CCR5 アンタゴニスト SCH-C の変異 X4 HIV-1 の誘導性、および樹状細胞免疫賦活を用いた HIV-1 増殖制御免疫誘導法に関する研究を行った。R5 HIV-1JR-CSF を感染させた 3 系統の hu-PBL-SCID マウスに、SCH-C を投与したが、一か月の観察期間内ではこのマウスで CXC4 を使う変異株は出現しなかった。AT-2 を用いて不活化した HIV-1 で感作した培養樹状細胞で hu-PBL-SCID マウスを免疫することにより、マウスは R5 HIV-1 感染に抵抗性を獲得する。その機序は、HIV-1 抗原応答性のヒト CD4+T 細胞が産生する未知の因子が関与することが示唆された。得られた免疫ヒト CD4+T 細胞を *in vitro* で種々の HIV-1 ペプチドで再刺激し、培養上清中の R5 HIV-1 抑制性 CD4 因子活性を測定したところ、抗原性を持つ認識ペプチドにはドナーにより多様性があった。また、単球から樹状細胞を誘導する培養系に培養初日から不活化 HIV-1 を添加することにより樹状細胞の誘導が顕著に阻害された。

A.研究目的：

hu-PBL-SCID マウスの HIV-1 感染実験系は、エイズの動物モデルである。この系を用いて未だ明らかにされていない HIV-1 coreceptor アンタゴニストの抗 HIV-1 効果、および樹状細胞免疫法を用いて誘導される抗 R5 HIV-1 免疫応答の詳細について検討することを目的とした。

B.研究方法(倫理面への配慮)：

(a) SCID マウスに成人 PBMC を移植した hu-PBL-SCID マウスに、R5 HIV-1 を感染させた 3 日後、CCR5 アンタゴニストの SCH-C を 5 日間連続投与し、CXC4 を使う変異株が出現するかどうか、回収血清、腹腔洗浄液、回収細胞を MT-2 細胞と培養した。

(b) 培養樹状細胞を不活化 HIV-1 抗原で感作し、hu-PBL-SCID マウスを免疫し、応答する CD4+T 細胞がどのような抗原を認識するのかをペプチドを用いて検討した。また樹状細胞の培養において、HIV-1 抗原処理の樹状細胞培養に及ぼす影響も検討した。

(c) この動物実験は、琉球大学の動物実験倫理委員会で審査され、許可されている。また供血者には十分な説明をして了解を得た上で協力をいただいた。

#### C. 研究結果：

(a) R5 HIV-1JR-CSF を感染させた 3 系統の hu-PBL-SCID マウス(C.B-17、NOG、RAG2 $\gamma$ c-系統)に、SCH-C を接種時に体内濃度が 10  $\mu$ M になるように ip 接種し、それを 1 日 1 回、5 日間連続投与した。このマウスで CXCR4 を使う変異株が出現するかどうか、回収血清、腹腔洗浄液、回収細胞を MT-2 細胞と培養したが、どのマウスのサンプルからも一ヶ月の細胞継代中に MT-2 細胞培養で増殖するウイルスは観察できなかった。

(b) 不活化 HIV-1 感作培養樹状細胞免疫した hu-PBL-SCID マウスから得られるヒト CD4+T 細胞を *in vitro* で種々の HIV-1 ペプチドで再刺激し、培養上清中の R5 HIV-1 抑制活性能を測定したところ、抗原性を持つ認識ペプチドには多様性があった。

(c) 単球から樹状細胞を誘導する培養系に培養初日から不活化 HIV-1 を添加することにより樹状細胞の誘導が顕著に阻害された。

#### D. 考察：

感染初期からエイズ期において感染者内に寄生する R5 HIV-1 の増殖抑制と CXCR4 使用 HIV-1 への変異を予防する治療法を開発することは、エイズ発症阻止につながる大きな目標である。今回、R5 HIV-1 感染 hu-PBL-SCID マウスの CCR5 antagonist SCH-C 投与では CXCR4 使用 HIV-1 が回収できなかったことは、以前に変異が起きることが報告されている CCR5 antagonist AOP-RANTES よりも SCH-C が変異予防に優れていることを示唆するのが、あるいは、今回の実験系が CXCR4 使用 HIV-1 への変異に対し抑制的に働く生体内環境なのかもしれない。

HIV-1 感作樹状細胞免疫で誘導されるヒト抗 HIV-1CD4+T 細胞群は、種々の HIV-1 ペプチドを認識し R5 HIV-1 抑制因子を産生することが明らかとなった。この因子のヒトでの機能は全く不明であるが、樹状細胞の機能が健全な HIV-1 感染初期の免疫応答で実際に産生されている因子である可能性が高い。実際、HIV-1 感染初期の血清には、R5 HIV-1 のマクロファージへの感染を抑制する因子が証明されている。したがって、このような R5 HIV-1 抑制因子の持続

的産生を促す免疫法の解明は、重要な課題であると考えます。

一方、免疫に用いる樹状細胞の量は、免疫応答誘導のキーポイントとなることから、*in vitro* での分化培養法の改良は将来の樹状細胞免疫療法には必須の基礎研究である。単球培養系に不活化 HIV-1 を添加することにより樹状細胞の分化が細胞死により阻害された。エイズ患者あるいは HIV-1 ウイルス量の高い感染者に見られる骨髄系樹状細胞の減少との関連性が示唆された。

#### E. 結論:

R5 HIV-1 の生体内での増殖を抑制する方法として、hu-PBL-SCID マウスを用いた CCR5 antagonist の評価、および樹状細胞を用いる HIV-1 免疫方法のさらなる研究開発はエイズ対策において重要な情報を与えると考えている。

#### F. 健康危険情報:

特になし。

#### G. 研究発表:

##### 1. 論文発表:

(1) Murakami T, Ablan S, Freed EO, and Tanaka Y. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 env-mediated membrane fusion by viral protease activity. *J Virol.* 78(2): 1026-1031, 2004.

(2) Yoshida A, Tanaka R, Murakami M, Takahashi T, Koyanagi Y, Nakamura M, Ito M, Yamamoto N, and Tanaka Y. Induction of protective immune responses against R5 HIV-1 infection in the hu-PBL-SCID mice by intra-splenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4<sup>+</sup> T cell origin. *J. Virol.* 77(16): 8719-8728, 2003.

##### 2. 学会発表:

(1) 吉田篤司、村上努、田中礼子、中村正孝、田中勇悦 : hu-PBL-SCID マウスの不活化 HIV-1 感作樹状細胞免疫で誘導される新規 R5 HIV-1 感染防御因子産生ヒト CD4<sup>+</sup>T 細胞が認識する HIV-1 抗原エピトープの多様性。第 33 回日本免疫学会総会・学術集会記録 第 33 巻 p293.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

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

## 「Vpr を介したエイズ発症阻止」に関する研究

分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 部長

HIV アクセサリー遺伝子である Vpr は、単球・マクロファージ系細胞へのウイルス初期感染に重要な役割を担う一方、患者血中や脳脊髄液中に存在し、潜伏感染した細胞からのウイルス産生を誘導する機能が報告されている。しかしこれまで、実際に患者血液中の Vpr 濃度に関する報告は無い。今回、

1. 二種類の抗体を組み合わせた解析により、エイズ症例の血漿中に分子量約 15kDa の蛋白質を検出し、その濃度が数 100 pg/ml 程度であることを明らかにした。
2. また、バクテリアで発現・精製した Vpr 画分を数 ng/ml の濃度で、潜伏感染した細胞株である U1 細胞の培養液中に添加すると、ウイルス産生が誘導されることを認め、このシステムを用いて、抗 Vpr 因子の探索を開始した。
3. 一次スクリーニングとして、Vpr に結合性を示す化合物を探索し、その後、ウイルス産生に対する阻害効果を検定した。その結果、約 2000 種類の海洋微生物抽出エキスの中から、一種類の抗 Vpr 因子の候補を見出した。

今後、この化合物を精製し、新規抗エイズ薬としての可能性を明らかにすることを旨とする。

## A. 研究目的

HIV の単球・マクロファージ系細胞への感染に重要な役割を担っている Vpr は、患者血清や脳脊髄液中に存在し、潜伏感染した細胞からのウイルス産生を誘導する機能が報告されている。しかし、実際に患者血中の Vpr 濃度を解析した報告は無く、Vpr のエイズ発症における役割は依然不明である。一方、ART 療法下でも生体内ではウイルス産生が継続していること、またこの際、単球・マクロファージが重要な役割を担っていることが明らかにされ、Vpr が新しい抗エイズ薬の標的遺伝子産物になり得ることが考えられるに至った。本研究では、Vpr の機能解析を行う一方、抗 Vpr 因子を探索し、新規抗エイズ療法の可能性を明らかにすることを目的としている。

患者血液中にどの程度の Vpr が存在するかについては Vpr/ELISA をセットし、これまで研究代表者である岩本博士や静岡県立こども病院、三間屋先生の協力を頂きながら解析してきた。しかし、明確な答えが得られなかった。そこで今回、2種類の抗体を組み合わせた免疫沈降・ウエスタン解析により、直接 15 kDa 蛋白質を検出することを試みる一方、おおよその血中濃度を把握することに力を注いだ。

一方、抗 Vpr 因子探索のソースとしては、海洋微生物抽出エキスをを用いることとした。海洋微生物は、新規生物が豊富な事、環境条件が陸上と全く異なることから、地上では合成が未だ確立していない新規化合物が見出される可能性があること、さらに精製を行うための初期サンプルとして、大量の

材料を調整することが可能であること、が利点として指摘されている。

本研究により、Vpr を標的とした新しい抗エイズ療法の開発が可能となり、患者予後を改善することに貢献できるものと期待される。

## B. 研究方法

## 1. 血中 Vpr の検出

Vpr の N-末側領域を認識する単クローン抗体を用いてまず免疫沈降を行い、次いで C-末端領域に結合するポリクローナル抗体によるウエスタン解析を行った。サンプルとして血漿 500 ul を用いた。検体は、国立千葉病院 (担当 小林千寿子医師) 及び仙台国立病院 (佐藤功医師) から供与を受けた。それぞれの施設の倫理委員会から本研究に関する承認を受け、さらに HIV 陽性者からの承諾を得た上で、検体を採取した。一方、標準サンプルとして、合成 Vpr を使用し、おおよその濃度を推定するための参考とした。

## 3. Vpr 発現と精製標品を用いたトランス作用の解析

バクテリアシステムを用いて GST-Vpr を発現させ、プレシジョンで切断後、Vpr を精製した。濃度測定は Vpr の ELISA システムを用いた。この精製標品を含む画分を U1 細胞に作用させ、3日後の培養上清中の p24 を測定した。

## 3. 抗 Vpr 因子探索

データベースとして登録されている 50 例の Vpr のアミノ酸を比較した。その結果、60-80 の部分 (以下 LR-20) が良く保存されている



ことを見出した。さらに合成した LR-20 と Vpr の結合を固相法により解析した。また、LR-20 を Vpr 誘発ウイルス産生系に添加し、効果を検定した。さらに、LR-20 と Vpr との結合をモニターするシステムを用いて、海洋微生物抽出エキスをを用いて抗 Vpr 因子の候補を探索を開始した。

### C. 研究結果

#### 1. 血中 Vpr の検出

HIV 陽性者 8 症例中 2 例で約 15 kDa のバンドが検出された。その濃度は、数 100 pg/ml であった。

#### 2. LR-20 の抗 Vpr 作用効果

Vpr 精製画分により誘導されるウイルス産生は、添加する LR-20 の量に依存して抑制された。また、ビオチン化 LR-20 ペプチドを用いたプルダウン後の Vpr に対するウエスタン解析の結果、LR-20 と Vpr は直接結合することを認めた。

#### 3. 抗 Vpr 因子探索

海洋微生物抽出エキス約 2000 種類について、まず LR-20 と Vpr の結合阻害を指標として、スクリーニングした。その結果、11 種類の候補が得られた。その中の 2 種類について抗ウイルス産生作用の有無を解析したところ、1 種類に陽性所見が認められた。

### D. 考察

Vpr が、患者血液中に存在することを見出した。これまで、Vpr 濃度を測定するための ELISA システムの確立を試みてきたが、健康人血漿でも高値を示す場合があること、また患者検体における陽性検体数が少なく、Vpr を検出しているかを評価することが困難であった。そこで今回、直接 15 kDa 蛋白質を検出することを試み、現在までに 8 例中 2 例にバンドを検出した。その濃度は、合成ペプチドを標準サンプルとして評価すると、数百 pg/ml であると推定された。

一方、Vpr に由来する配列である LR-20 が Vpr と結合することを見出すと共に、LR-20 が Vpr により誘導されるウイルス産生能を阻害することを見出した。この事実は、Vpr の機能発現には、Vpr 自身が会合することが必要であることを示唆する。この詳細の機序については、今後解析する予定である。

LR-20 と Vpr の結合様式を用いて、海洋微生物抽出エキスを対象に抗 Vpr 因子の探索を開始した。約 2000 の検体から今回一種類の候補を得ることに成功した。今後、この化合物を精製。同定し、合成標品を用いて抗 Vpr 機能を明らかにする予定である。

### F. 結論

1. 患者血中に Vpr が存在することを認めた。その濃度は、数 100 pg/ml であった。この知見は Vpr の機能解析を行うための実験的根拠になり得る重要な情報と思われる。
2. 抗 Vpr 因子を探索することが可能なシステムが整った。今後広くソースを収集し、可能な限り、抗 Vpr 因子の候補をスクリーニングする予定である。このような試みを通して、新しい標的産物に対する新規抗エイズ療法の開発を目指す。

### E. 健康危険情報 ; 特記事項なし

### F. 研究発表

1. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, in press.
2. Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata, M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 13-19, 2003.

### 2. 学会発表

1. 大沢宜明、志村まり、鈴木康哲、石坂幸人 HIV アクセサリー遺伝子産物と結合する宿主側蛋白質の同定及び機能解析. 第 26 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月, 2003.
2. Shimura M and Ishizaka Y. Disrupted nuclear HP1 with premature chromatid separation by epigenetic effects of HIV-1 VPR. EMBL meeting; Chromatin and Epigenetics, Heidelberg, Germany, 6 月, 2003.
3. 志村まり、鈴木康哲、石坂幸人 HIV

アクセサリ遺伝子 VPR によるゲノム不安定性と HP1 $\alpha$  第 25 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月, 2003.

**H. 知的財産権の出願:** なし

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 1. 書籍

該当なし

## 2. 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamada, T., Kaji, N., Odawara, T., Chiba, J., Iwamoto, A.	Proline 78 is crucial for human immunodeficiency virus type 1 Nef to down-regulate class I human-leukocyte antigen.	J. Virol.	77	1589-94	2003
Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B.	Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs.	J Virol	77	10250-9	2003
Sakuragi, J., Ueda, S., Iwamoto, A, and Shioda, T.	Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging.	J. Virol.	77	4060-4069	2003
Endo, T., Miura, T., Koibuchi, T., Nakamura, H., Takahashi, T., Odawara, T., Goto, M., Ajisawa, A., Iwamoto, A., and Nakamura, T.	Molecular analysis of human herpesvirus 8 using single nucleotide polymorphisms in open reading frame 26.	J. Clin. Microbiol.	41	2492-2497	2003
Miura T, Goto M, Hosoya N, Odawara T, Kitamura Y, Nakamura T, Iwamoto A.	Depletion of mitochondrial DNA in HIV-1-infected patients and its amelioration by antiretroviral therapy.	J Med Virol.	70	497-505	2003
Komuro, I., Yokota, Y., Yasuda, S., Iwamoto, A., and Akagawa, K.S.	CSF-induced and HIV-1-mediated distinct regulation of Hck and C/EBP represent a heterogeneous susceptibility of monocyte-derived macrophage to M-tropic HIV-1 infection.	J. Exp. Med.	198	443-453	2003
Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiya, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and Ariyoshi, K.	Impaired epitope processing and presentation as a major escape mechanism from CTL recognition in HIV-1 infection.	J. Virol.	78	1324-332	2004
Yamada, T., Watanabe, N., Nakamura, T and Iwamoto A.	Antibody-dependent cellular cytotoxicity via a humoral immune epitope of Nef protein expressed on the cell surface.	J. Immunology.	172	2401-6	2004
Nakayama, E. E., Tnaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A., and Shioda, T.	A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform.	AIDS		In press	2004

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sakuragi, J., Ueda, S., Iwamoto, A. and Shioda, T.	Possible role of dimerization in Human Immunodeficiency virus type 1 genome packaging.	<i>J. Virol.</i>	77	4060-4069	2003
Matano, T., Kano, M., Takeda, A., Nakamura, H., Nomura, N., Furuta, Y., Shioda, T. Nagai, Y.	No significant enhancement of protection by Tat-expressing Sendai viral vector-booster in a macaque AIDS model.	<i>AIDS</i>	17	1392-1394	2003
Nakayama, E. E., Tanaka, Y., Nagai, Y., Iwamoto, A. and Shioda, T.	A CCR2-V64I polymorphism affects stability of CCR2A isoform.	<i>AIDS</i>	18	In press	2004