

平成15年度厚生労働科学研究研究費補助金

エイズ対策研究事業

課題番号 H13-エイズ-002

HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び  
増殖制御に関する研究

総括・分担研究報告書

平成16年3月

主任研究者 佐藤 裕徳

(国立感染症研究所・遺伝子解析室・主任研究官)

## 研究組織

研究者名	分担	所属	役職
佐藤 裕徳	班長	国立感染症研究所・遺伝子解析室	主任研究官
原田 信志	班員	熊本大学大学院・医学薬学研究部感染防御分野	教授
森川 裕子	班員	北里大学附属北里生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室	教授
服部 俊夫	班員	東北大学・感染症呼吸器内科	教授
間 陽子	班員	理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット	ユニットリーダー
増田 貴夫	班員	東京医科歯科大学大学院・歯医学総合研究科	助教授
岡本 尚	班員	名古屋市立大学大学院・医学研究科生体機能分子医学講座	教授
増田 道明	班員	獨協医科大学・微生物学講座	教授
足立 昭夫	班員	徳島大学大学院・医学研究科ウイルス病原学分野	教授
生田 和良	班員	大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野	教授
櫻木 淳一	班員	大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染分野	助手
田代 啓	班員	京都大学遺伝子実験施設・遺伝病解析分野	助教授
松田 善衛	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	室長
仲宗根 正	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
高橋 秀宗	班員	国立感染症研究所・感染病理部	室長
小島 朝人	班員	国立感染症研究所・感染病理部	室長
巽 正志	班員	国立感染症研究所・獣医科学部	主任研究官
村上 努	研究協力者	琉球大学大学院 医学研究科免疫学分野	助教授
三隅 将吾	研究協力者	熊本大学大学院 医学薬学研究部薬学生化学分野	助教授
明里 宏文	研究協力者	国立感染症研究所・霊長類センター	主任研究官
駒野 淳	研究協力者	国立感染症研究所・エイズ研究センター	研究官
久保 嘉直	研究協力者	長崎大熱帯医学研究所・エイズ感染防御分野	助手

## 目次

### I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書..... 1  
主任研究者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所・遺伝子解析室）

### II. 分担研究報告書

#### 柱1 HIV複製の分子素過程の研究

##### (i) HIV細胞吸着・侵入・脱殻の制御

1. 細胞膜流動性と機構に関する研究..... 9  
分担研究者：原田 信志（熊本大学大学院・医学薬学研究部感染防御分野）
2. 膜融合に対する HIV-1 gp41 膜貫通領域の寄与—融合後期過程への寄与..... 13  
分担研究者：松田 善衛（国立感染症研究所・エイズ研究センター）
3. gp120 のトロンピンによる活性化..... 17  
分担研究者：服部 俊夫（東北大学・感染症呼吸器内科）
4. HIV-1 感染症における血中 SDF-1 濃度研究及び gp120 結合化合物研究について..... 21  
分担研究者：田代 啓（京都大学遺伝子実験施設・遺伝病解析分野）
5. HIV 侵入過程を再現する無細胞系作製の試み..... 25  
分担研究者：小島 朝人（国立感染症研究所・感染病理部）
6. Env/Gag 蛋白の相互作用と HIV-1 細胞侵入との関連..... 27  
研究協力者：村上 努（琉球大学大学院・医学研究科免疫学分野）
7. HIV-1 生活環におけるアクチンの役割に関する研究..... 31  
研究協力者：駒野 淳（国立感染症研究所・エイズ研究センター）
8. methyl- $\beta$ -cyclodextrin による CD4-independent HIV-1 感染の阻害..... 35  
研究協力者：久保 嘉直（長崎大熱帯医学研究所・エイズ感染防御分野）

##### (ii) プロウイルス DNA 細胞質内輸送の制御

9. HIV-1 Vpr と相互作用する細胞内因子の解析..... 36  
分担研究者：間 陽子（理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット）
10. HIV cDNA の核内移行過程におけるインテグラーゼの機能的関与..... 43  
分担研究者：増田 貴夫（東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科）

##### (iii) プロウイルス DNA 転写の制御

11. 潜伏感染 HIV の複製誘導に関わる NF- $\kappa$ B のリンフォトキシン $\beta$ レセプター・シグナルによる活性化機構に関する研究..... 49  
分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院・医学研究科生体機能分子医学講座）
12. T細胞サブセットと HIV トロピズム..... 53  
分担研究者：生田 和良（大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野）

(iv) HIV 複製後期過程の制御	
13. HIV-1 Gag 蛋白の細胞質内輸送経路の解析.....	57
分担研究者：森川 裕子 (北里大学附属北里生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室)	
(v) Vif 機能の制御	
14. HIV アクセサリー蛋白質の機能解析.....	61
分担研究者：足立 昭夫 (徳島大学大学院・医学研究科ウイルス病原学分野)	
15. HIV-1 Vif タンパク質機能の分子機構に関する研究.....	65
研究協力者：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)	
(vi) 細胞周期の制御	
16. HIV-1 Vpr による宿主細胞周期のかく乱機構に関する研究.....	69
分担研究者：増田 道明 (獨協医科大学・微生物学)	
(vii) ウイルス粒子の因子	
17. HIV 粒子のプロテオーム解析.....	71
研究協力者：三隅 将吾 (熊本大学大学院・医学薬学研究部薬学生化学分野)	
<b>柱2 易変異性研究</b>	
(i) 逆転写酵素基質選択性の制御	
18. HIV 逆転写酵素の基質選択性の制御に関する研究.....	75
主任研究者：佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・遺伝子解析室)	
(ii) ゲノム RNA 構造・機能の制御	
19. HIV-1 ゲノム RNA の発芽前後における性状変化と宿主因子の解析.....	79
分担研究者：高橋 秀宗 (国立感染症研究所・感染病理部)	
20. HIV ゲノム二量体化に関する研究.....	83
分担研究者：櫻木 淳一 (大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染分野)	
<b>複製・変異研究支援のための技術開発</b>	
21. HIV-1 感染性クローン樹立法の効率化について.....	89
分担研究者：巽 正志 (国立感染症研究所・獣医科学部)	
22. 日本伝播 HIV-1 集団の遺伝子・分子生物学的解析及び分子力学的構造解析.....	93
分担研究者：仲宗根 正 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
<b>III. 業績一覧 (2003)</b> .....	97

# 1. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）  
HIV 及びその関連ウイルスの増殖機構及び増殖制御に関する研究

平成 15 年度 総括研究報告書

主任研究者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所・主任研究官）

研究要旨

【目的・意義・方法】 HIV 複製・変異について理解を深め、新たな作用点をもつ HIV 増殖阻止法の開発に資する。2本の研究の柱①HIV 複製と②HIV 変異性発現の分子素過程研究を設定し、分子生物学、生化学、細胞生物学、ウイルス学の諸手法を用いて解析し、以下の新知見を得た。

【成果】

- (1) HIV 分子と直接相互作用し、複製・変異に関与しうる細胞分子の同定：①ATP（逆転写酵素に結合し、基質選択性の向上に関与）（佐藤）、②転写因子 AP-4（Tat と結合し OGG1 産生を誘導することでゲノム変異= transversion を抑制？）。
- (2) 他の複製制御関与因子の同定（HIV 分子との直接相互作用は無い、もしくは未解析）：①アクチン新鎖合成制御因子 Arp2/3（ウイルス侵入とゲノム逆転写の間の反応に関与）（駒野）、② CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>T 細胞サブセット特異的転写因子 AP-1（X4 ウイルス転写に関与）（生田）、lymphotoxin  $\beta$ （プロウイルスゲノム転写に関与）（岡本）、③エンドソーム因子 end3, 4, 5, 6, Tlg2, Pep12（酵母での Gag 細胞質輸送・集合に関与）（森川）、④細胞周期制御因子 14-3-3（酵母での Vpr 依存 G2 arrest 誘導に関与）（増田道）。⑥炎症由来血中因子トロンピン（Gp120 構造変化誘導活性と HIV 感染促進効果をもつ）（服部）。
- (3) HIV 分子の機能制御領域・相互作用・修飾の同定：①Env Gp41 膜貫通領域（HIV 粒子吸着・侵入の際の膜融合孔形成と拡大に関与）（松田）、②Gag MA と Env Gp41 細胞質領域相互作用（ウイルス粒子の Gp41 膜融合活性の発現に関与）（村上）、③Vif：アミノ酸残基 86-89、63-70  $\beta$ -ストランド構造（Vif 発現量とウイルス感染性の維持に関与）（足立）、残基 4-23（Vif 依存 p2/NC プロセッシング阻害に関与）（明里）、④粒子内ゲノム二量体化シグナル（ゲノム RNA 二量体化に関与）（櫻木）、⑤ウイルス粒子内蛋白質修飾の同定（Gag p24 N 末プロリンホルミル化とサイクロフィリン A isoform、生理的意義不明）（三隅）。
- (4) 新規技術・解析系の樹立：①感染性 HIV 分子クローン樹立の効率化（MAGIC5 細胞+PCR 増幅系）（巽）、②HIV 細胞侵入を再現する無細胞系の予備的樹立（精製細胞膜画分+精製 HIV 粒子）（小島）、③血中サイトカイン（SDF-1, IL-2, -4, -8, -10, MCP-1, Eotaxin, GM-CSF, TGF- $\beta$ 1, FN- $\gamma$ ）の高精度測定系の樹立（田代）。

【課題】これらの因子が、生理環境下で複製・変異の制御に関与するかを検証し、構造解析専門家との連携により、新規薬剤開発に発展させる。

分担研究者（16名）

原田 信志：熊本大学大学院・教授  
服部 俊夫：東北大・教授  
田代 啓：京都大遺伝子実験施設・助教授  
間 陽子：理化学研・ユニットリーダー  
増田 貴夫：東京医科歯科大大学院・助教授  
岡本 尚：名古屋市立大大学院・教授  
生田 和良：大阪大微生物病研・教授  
森川 裕子：北里大生命科学研・教授

足立 昭夫：徳島大大学院・教授  
増田 道明：獨協医科大・教授  
櫻木 淳一：大阪大微生物病研・助手  
松田 善衛：国立感染研・室長  
仲宗根 正：国立感染研・主任研究官  
小島 朝人：国立感染研・室長  
高橋 秀宗：国立感染研・室長  
巽 正志：国立感染研・主任研究官

## 研究協力者（5名）

久保 嘉直：長崎大・助手  
村上 努：琉球大・助教授  
三隅 将吾：熊本大学大学院・助教授  
駒野 淳：国立感染研・研究官  
明里 宏文：国立感染研・主任研究官

### A. 研究目的

現在4000万人に達する HIV 感染者、急増する新規感染者は、放置すればほぼ確実に死に至る。HIV 感染者の治療法確立は、国内外の厚生労働行政上の重要課題であり、現時点では薬剤治療が唯一の治療手段である。

現行の薬剤治療の主要な問題点に、耐性獲得が挙げられる。この問題に対処する中長期戦略として、①新たな作用点・様式をもつ抗 HIV 薬の開発、②HIV 易変異性の理解と制御手段の開発、の2点が挙げられる。その実現、およびワクチン等他の手段による予防治療を現実的なものにするには、HIV の複製および易変異性に関する基礎研究基盤の充実が必須であることは論を待たない。

国内の HIV 複製・易変異性研究は、開始後十数年を経て多様化が進む反面、個々の力が分散する傾向にある。本研究班では、高い潜在能力を有しながら総花的傾向が強まっているこれらの基礎研究を、ウイルスの理解と制御に焦点を絞った研究へと転換し、HIV 増殖研究の質と効率の向上を目指す。得られる学術成果は、HIV 感染症の理解、予防治療法の開発と改良、国民の教育と啓蒙に役立てる。

### B. 研究方法

1) 全体計画：以下を3年計画で遂行。①研究の2本の柱を設定（HIV 複製と易変異性発現の分子素過程研究）。②研究組織：17人の主任・分担研究者と5名の研究協力者。③立体構造研究の推進。④萌芽的研究の推進：研究協力者としての参画を募り、研究の活性化を計る。⑤成果の情報収集と班員間の交流推：シンポジウム、テーマ別ワークショップ開催。⑥成果評価：基礎（ウイルス学）・応用（薬剤開発研究への適用）の2点を基準に評価。

#### 2) 分担研究方法

分子生物学、分子遺伝学、細胞生物学、ウイルス学の諸手法を用いてHIV複製・変異の新

たな調節因子（細胞因子、ウイルス因子）を同定する。解析方法は、各研究者の創意工夫による。本研究班で用いられた代表的方法を以下に記す。

①相互作用因子の探索：酵母two-hybrid系、pull-down assay、pulse-chase 免疫沈降など。

②機能的関与の検証：変異導入解析、対象が酵素の場合は反応速度解析。

③複製関与の検証：変異導入解析、RNAiによる特定 mRNA 機能の不活化、dominant negative変異体による特定蛋白質機能の不活化など。

#### 3) 立体構造解析

生体高分子と低分子化合物の立体構造解析と分子認識解析は、HIV 複製・変異調節の理解と新規薬剤開発に必須である。しかし、国内のウイルス学研究は、概して構造解析への取り組みが遅れている。この点の改善を目指す。

①計算科学的手法の導入：カナダCCG社の統合計算化学システムMOEの導入、有効使用できる人材（物理化学の素養を有するリサーチ・レジデント）の育成。

②X線結晶構造解析：蛋白質大量発現・精製系の導入、構造解析研究者との研究交流の開始。

#### （倫理面への配慮）

規定項目の遵守により、本研究の遂行に倫理面の問題は無いと判断した（研究計画書10. 倫理面への配慮の項参照）。

### C. 研究結果

#### I. 柱1：複製の分子素過程研究

##### 1) HIV-1 の細胞吸着・侵入・脱殻（分担研究者）

①原田：温度、界面活性剤、細胞表面抗体が、細胞膜脂質二重層の流動性（電子スピンラベル法）、HIV の細胞吸着量（p24-ELISA）、HIV 感染性（GHOST/CXCR4-NL43env/luciferase 系）に与える影響を検討し、これらの間に相関関係があることを示唆した。

②松田：gp41 膜貫通領域の変異導入解析により、この領域が HIV-細胞膜融合過程のうち fusion pore 拡大または安定化に重要な役割を果たすことを示唆した。

③服部：炎症由来の血中因子トロンピンに

Gp120 構造変化/活性化に基づく HIV 感染促進効果があることを示唆した。

④田代：低分子 HIV 増殖阻害剤の作用機構を検討 (BLAcore、単分子追跡法) し、Gp120 への直接結合を示唆。HIV 感染者血中の種々のサイトカイン/リンフォカイン (IL-2, -4, -8, -10, MCP-1, Ieotaxin, GM-CSF, TGF- $\beta$ 1, FN- $\gamma$ ) を高い精度で測定する方法を樹立した。

⑤小島：精製細胞膜画分と精製 HIV 粒子を用い、HIV 細胞侵入を再現する無細胞系の作製を試み、Env-HIV 受容体結合を介して脱殻が進行する系を樹立した。

(研究協力者)

⑥村上：プロテアーゼ欠損、gp41CT 変異の濃縮ウイルス粒子と Env の立体構造特異的抗体を用い、粒子内 Gag プロセッシングは HIV の細胞膜受容体結合、Env 融合中間体 (6-helix bundle) 形成に必要なことを示唆した。

⑦駒野：アクチン新鎖合成制御因子 Arp2/3 の dominant negative 変異体-GFP 融合蛋白質 (GFP-VCA, GFP-NTA)、Arp2/3 標的 siRNA などを発現するヒト細胞では HIV 感染効率 (レポーターアッセイ系) が低下することを示唆。この Arp2/3 機能維持要求性は、レンチウイルスに特徴的性質であることを示唆した。

⑧久保：CD4-independent HIV-1 感染が methyl- $\beta$ -cyclodextrin により阻害されることを示し、セカンドレセプターを介する細胞侵入にラフト構成成分 (コレステロール) が重要な働きをすることを示唆した。

## 2) プロウイルス DNA 細胞質内輸送

①間：Vpr N 末  $\alpha$ -helix 点変異体は、importin  $\alpha$  (Rch1) 結合能を欠損し (pull-down assay)、Vpr のマクロファージ/CD4 T 細胞における核移行活性を失い (Digitonin 処理 HeLa 細胞/細胞質画分を用いた in vitro 核移行アッセイ)、ウイルスのマクロファージ/CD4 T 細胞における感染性の減弱 (感染性分子クローン/初代培養細胞) することを示した。

②増田 (貴)：インテグラーゼ PYNP または KKK モチーフの変異は、同酵素のプロウイルス DNA 結合能の低下 (野生株比 10%以下、

pull-down 法)、ウイルス感染性の低下 (野生株比 1%以下、NL43-luciferase- MLV env pseudotype virus アッセイ系)、ウイルス DNA 核内量の低下 (野生株比 30%以下、FISH 解析) を誘起することを示した。

## 3) プロウイルス DNA 転写

①岡本：NF- $\kappa$ B 活性化因子 (NIK, IKK  $\alpha$ , IKK  $\beta$ ) の dominant negative 変異体、NF- $\kappa$ B 変異体導入ヒト細胞を用い、リンフォトキシン  $\beta$  受容体のシグナル伝達に起因する NF- $\kappa$ B 活性化 (luciferase 活性を指標) は、NIK と IKK  $\alpha$  経路を介すること、NF- $\kappa$ B p65 セリン残基 (536S) リン酸化に依存することを示唆した。

②生田：CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>T 細胞における HIV-1 X4 virus の高産生は、ウイルスゲノム転写効率の昂進に起因すること (NL43, NL43-luciferase-VSV-G pseudotype virus/CD38<sup>+</sup> サブセット感染系 / RT-PCR, luciferase 活性) を示し、CD38<sup>+</sup> サブセット特異的発現遺伝子を ~24 個に絞った (GeneChip 法、GeneFishing 法)。

## 4) HIV 複製後期

①森川：種々のエンドソーム小胞形成・輸送欠損・変異酵母 (zymolyase 消化により細胞壁を除去) における Gag 局在 (抗 CA 抗体・細胞小器官指標蛋白抗体/免疫染色) と粒子形成 (蔗糖密度勾配遠心/抗 CA 抗体 Western blot) を調べることにより、endo3, 4, 5, 6, t-SNAREs (Tlg2, Pep12) が Gag 形質膜輸送と粒子形成に必要なことを示した。

## 5) Vif 機能調節

①足立：プロテアソーム阻害剤 (MG-132) が細胞内ポリユビキチン化 Vif の蓄積量を増し、Vif 分解を抑制すること (Pulse-chase 免疫沈降法と Western blot 法)、Vif  $\beta$ -ストランド構造 (アミノ酸残基 86-89、63-70) が Vif 発現量維持とウイルス感染性に必須であること (欠失変異体感染系) を示した。

(研究協力者)

②明里：一連の Vif 変異体のウイルス取り込み効率 (Western blot 法) と p2/NC プロセッシング阻害効率 (Gag 中間体 p33/34 量を指



標)を解析し、両機能を規定する Vif 領域は独立して存在すること(アミノ酸残基 75-109 と 4-23)、ウイルス取り込みはプロセッシング阻害活性発現に必要なが十分条件ではないことを示唆した。

#### 6) 細胞周期調節

① 増田道: Vpr 発現誘導プラスミド(pREP1-vpr)導入rad24欠損分裂酵母(Vpr発現に伴うcdc表現型欠損株)に、ヒト14-3-3ファミリー遺伝子( $\beta, \gamma, \epsilon, \zeta, \eta, \theta$ )発現プラスミドを導入し、 $\beta, \epsilon, \zeta$ にcdc表現型(Vpr依存的G2 arrest誘導)を復帰させる機能があることを示した。

#### 7) HIV 粒子のプロテオーム解析

(研究協力者)

① 三隅: HIV-1 LAV-1 株(X4株)とJRFL株(R5株)感染T細胞(CEM, CEM-CCR5)の培養上清からウイルス粒子を精製し(ズブチリン処理/Sepharose CL-4B)、粒子構成蛋白質の生化学的性質を比較検討中(MALDI TOF-MS 質量分析、データベース検索)。

### II. 柱2: 易変異性発現の分子素過程研究

#### 1) 逆転写酵素基質選択性の調節

① 佐藤: 細胞質濃度のATP(mM)が精製逆転写酵素(Ni親和性クロマトグラフィー/ゲルろ過)の基質選択性に及ぼす影響を反応速度解析により調べ、ATPはRTの可逆的非競合阻害(混合阻害)因子であること( $V_{max}, K_m, k_{cat}$ 低下)、基質親和性の昂進( $K_m$ 低下)と基質アナログ抗HIV薬の親和性低下( $K_i$ 増加)を誘起することを示した。

#### 2) ゲノムRNA構造・機能の調節

① 高橋: HIV粒子発芽後ゲノムRNAに生じるニック(gag領域RT PCRで定量)とウイルス感染性(luciferase活性)を調べた結果、発芽後8時間で完全なゲノムRNAは10%以下(発芽直後と比較)に低下したが、感染性は70%保持されていることを示唆した。

② 櫻木: HIV-1 RNAパッケージングシグナル内*in vitro*二量体化シグナル領域(E/DLS, 約500塩基)をHIV-1 NL43 Env領域に挿入した変異体DDNBAを作製し、DDNBAの片方

のE/DLSの変異導入/粒子内二量体化解析(粒子精製/Northern blot法)を行い、粒子内*in vivo*ゲノム二量体化の必要十分領域を同定した。

### III. 複製・変異支援のための技術開発

#### 1) 感染性分子クローン樹立の効率化

① 巽: Vpr/Vif領域をprimerとするPCRによりプロウイルスDNA5'-halfと3'-halfを増幅することで(Half & Half戦略)、従来法(LTR long PCR)より効率的にゲノム全長クローニングを行った。MAGIC-5A細胞を利用し(HIV Trapping系)、HIV-1 subtype C, A, Gの感染性クローンを多数樹立した。

#### 2) 計算科学的手法の検討

② 仲宗根: KD247抗体による中和効率が判明しているHIV-1 10株のEnv V3ループ分子モデルを構築し、蛋白質構造系統樹解析ソフト(ProCluster)を用いて構造の相関関係を調べた結果、中和感受性株と非感受性株V3は別の系統樹クラスターを形成した。

### D. 考察

#### I. 全体

1) 実施経過: HIV複製・変異を理解するうえで重要な細胞因子、HIV分子-細胞装置の相互作用、HIV分子領域が新たに複数見出された。新規抗HIV薬開発のための標的分子候補が複数得られた。

2) 意義と課題: 当該研究の成果を発展させることにより、HIV複製・変異の理解向上と新規薬剤開発への発展が期待される。しかし、これを可能とするにはまだ時間を必要とする。当該研究関連課題(HIVウイルス学基礎研究)の継続、研究基盤のさらなる活性化(研究人口と研究費の増加)、立体構造解析研究者を中心とする関連研究者との連携が必要と考えられる。

### II. 当該年度の分担研究成果

#### II-1. 複製素過程の理解

##### 1) HIV-1の細胞吸着・侵入・脱殻の理解

HIV感染初期過程については、研究の多くがEnv Gp120-CD4/ケモカイン受容体の分子間相互作用解析に集中している。しかし、

吸着後、侵入から逆転写反応の開始に至る反応は、ほとんど解明されていない。当該研究は、これら未知の感染初期過程の理解について新たな着目点と手法に基づき研究し、以下の重要な進展を見せた。

① Arp2/3 機能の複製関与の示唆 (駒野) : 細胞骨格構成蛋白質アクチンの制御因子である Arp2/3 の機能維持が、ウイルス-細胞膜融合と逆転写反応の間の過程に必要であることが dominant negative 変異体解析により世界で初めて示唆された。

この発見は新規性が高く、以前より関与が指摘されていたが立証の遅れているアクチン/細胞骨格系の HIV 複製における役割を解明する手がかりとなりうる。Arp2/3、または関連アクチン制御因子と HIV 分子の直接相互作用がおきるのかは薬剤開発の点からも重要であり、今後の重要課題と考えられる。

② HIV 侵入における Env-受容体多重結合の必要性 (原田、久保) : ウイルス侵入には、Env Gp120-CD4/ケモカイン受容体の単分子間相互作用に起因する局所膜融合のみでは不十分で、Env-受容体多重結合・fusion pore 拡大を必要とする旨の作業仮説 (multiple-site binding 仮説) が提唱されている。これが正しいければ、受容体の極微量面局在が侵入効率を決定する要因となることが予測される。

今回、電子スピラベル法を用いた解析により、脂質二重膜の流動性変化が HIV 感染効率の変動を誘起することが示された (原田)。また、細胞膜ラフト構造の維持が CXCR4 を介する HIV 感染の効率決定要因であることが示された (久保)。

以上の結果は、HIV 侵入時の受容体の極微量面局在または再集合による多重結合の必要性を支持し、新たな HIV 侵入制御法立案の手がかりとなりうる。

③ 膜融合素過程制御の理解 (松田、村上) : Env Gp120-受容体結合後の膜融合過程は、Env Gp41 構造変化に伴う fusion peptide insertion-lipid mixing-cytosol mixing-fusion pore 拡大の順に進行すると想定されている。

今回、Gp41 膜貫通領域 GxxxG モチーフ (膜蛋白質ヘリックス間相互作用に寄与すると仮定されている) 変異・置換解析により、この領域が fusion pore 拡大、または安定化

などの膜融合後期過程に重要な役割を果たすことが示唆された (松田)。さらに、HIV プロテアーゼと Gp41 細胞質ドメインの変異導入解析により、Gp41 の膜融合活性は Gag MA 構造変化により制御されている (Gp41 細胞質ドメイン-Gag 前駆体結合型は融合非活性型で、粒子内 Gag プロセッシングにより MA 構造変化・Gp41 親和性低下がおきることで Gp41 は膜融合活性型となる) ことを示唆する結果を得た (村上)。

以上の結果は、膜融合過程は Gag、および Gp41 非融合領域の構造により複合的に制御されていることを示唆する。

④ in vivo HIV 感染・病態進行影響因子の理解 (服部、田代) : 炎症組織由来トロンビンの HIV 感染初期過程に及ぼす影響を解析し、トロンピンには Env Gp120 と Gp41 構造変化を誘導し、膜融合能を促進する効果があることを示した (服部)。感染者血中の SDF-1 濃度と病態進行の関連を米国コホート検体を用いて解析中 (田代)。

これらの研究は、in vivo HIV 感染・病態進行の制御に重要となる可能性がある。

2) プロウイルス DNA 細胞質内輸送の理解 (間、増田貴) : プロウイルス DNA は自由拡散で染色体組み込み部位に到達するとは考えにくく、能動的な細胞質内輸送、核内輸送が起きている可能性が高い。これに関わるウイルス分子として Vpr とインテグラーゼが指摘されている。当該研究ではこれらの分子が利用する細胞内分子輸送関連装置について解析し、以下の重要な知見を得た。

Vpr (間)、ならびにインテグラーゼ (増田貴) に、種々の細胞内核移行調節因子 (importin  $\alpha$  など) 結合活性があることを見出した。変異導入解析により、この相互作用がプロウイルス DNA の核移行に関与すること、HIV 複製に役割を果たしていることを支持する観察結果を蓄積した。

今後それぞれのウイルス分子/宿主因子の複製における役割分担を整理していく必要がある。HIV 分子との直接結合を介して機能発現する可能性があることから、薬剤開発の有力な標的分子となりうる。

3) プロウイルス DNA 転写の理解 (岡本、生

田) : HIV 転写の主な調節因子はウイルス分子 Tat と Rev であることが判明している。しかし、Tat と Rev 発現には細胞の基本転写因子と HIV LTR 相互作用が必要であり、その制御は HIV 転写を律束しうる。

酵母 two-hybrid 系、dominant negative 変異体解析系の進展により、LTR 機能の trans 制御因子 NF- $\kappa$ B の活性制御経路の理解が進み、新たに NIK と IKK $\alpha$  経路の関与と NF- $\kappa$ B 相互作用領域が明らかになった(岡本)。さらに、CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>T 細胞において HIV-1 X4 virus の高産生が起ることが見い出され、これに関与する CD38<sup>+</sup>サブセット特異的発現遺伝子の絞り込みが進んだ(生田)。

HIV 蛋白質分子との直接結合を介する複製制御ではないため、薬剤開発には慎重な検討を必要とするが、LTR 機能制御に基づく新規薬剤開発の可能性を提示する重要知見と考えられる。

4) HIV 複製後期の理解(森川) : 複製後期の制御研究はウイルス粒子成熟研究が先行している。プロテアーゼ機能制御は既に薬剤開発に適用され、新たに細胞質内輸送系のウイルス粒子構成分子集合における役割の重要性が指摘されている。当該研究により、後者の理解が着実に進んだ。

エンドソーム小胞形成制御因子および初期・後期エンドソーム小胞輸送制御因子の中から、HIV Gag の形質膜集合の責任因子の絞り込みが進んだ(森川)。

酵母を用いた解析のため、今後ヒト細胞における重要性を立証する必要がある。しかし、HIV 分子との直接結合を介して機能発現する可能性があることから、薬剤開発の有力な標的分子となりうる。

5) Vif の意義・機能調節の理解(足立、明里) : Vif は HIV 複製に必須であることが確かめられている。近年、Vif の APOBEC3G 活性抑制効果が着目され、Vif 機能研究が急速に進展している。

当該研究では、Vif の多機能性に着目し、Vif 発現制御(足立)並びに Vif の新たな作用点(明里)に関する理解が進んだ。

HIV アクセサリー遺伝子産物を標的とする薬剤開発に重要な知見と考えられ、今後の

Vif-細胞因子複合体の構造解析が期待される。

6) 細胞周期調節の理解(増田道) : Vpr による細胞周期調節(G2 arrest)は、HIV 複製効率の昂進に役立つことが指摘されている。

当該研究により、Vpr による細胞周期調節経路に関わる細胞因子の絞り込みが着実に進んだ。

Vpr と直接相互作用する因子の同定は今後の課題であるが、HIV 増殖抑制をもたらす新規薬剤の開発に向け、重要な知見が得られた。

7) HIV 粒子構成因子の修飾状況が複製に果たす役割についての理解(三隅) : HIV 粒子構成因子として種々のウイルス/細胞分子が報告されている。このうち、ウイルス因子の修飾の複製における役割、細胞因子の役割については不明な点が多い。

当該研究では、HIV-1 粒子のプロテオーム解析により、複製効率に影響しうる種々の因子の生化学的特徴について理解が進んだ。

HIV 粒子感染性の制御を立案する上で重要な知見と考えられる。

## II-2. 変異素過程の理解

1) 変異性調節の理解(佐藤) : 逆転写精製標品の変異導入効率と HIV 複製の際の変異率には齟齬があることから、細胞質因子による逆転写酵素機能の trans 制御の可能性が考えられる。しかし、制御の実体は全く不明である。

当該研究では、精製逆転写酵素の反応速度解析により、ATP に逆転写酵素基質親和性の制御活性があることが世界で初めて明らかにされた。

変異性制御という全く新しい HIV 制御法立案の手がかりとなる重要知見と考えられる。逆転写酵素-ATP 相互作用(分子認識)の解明、HIV 複製・変異発現における ATP の関与の立証は、今後の検討課題である。

2) ゲノム組換え制御の理解(高橋、櫻木) :

ゲノム RNA 組換えは HIV 変異性の促進に重要な役割を果たしうる。当該研究により、ゲノム組換え効率に影響しうる因子の理解が進んだ。

① 粒子内ゲノム性状の意義と理解(高橋) : HIV 粒子発芽後のゲノム RNA の生化学的性

状（ニックの生成と修復）は、組換え効率の決定要因となりうる。しかし、粒子内のゲノムRNA性状の制御因子は全く分かっていない。

当該研究により、ニック生成（Gag NC）と修復（topoisomerase I）の調節機構の存在が、世界で初めて明らかにされた。

組換え効率の人為制御の手がかりとなる重要知見と考えられる。今後、HIV 変異性（ゲノム組換え効率）決定にこれらの因子が直接関与するのかを立証していく必要がある。

② ゲノム二量体の理解（櫻木）：粒子内 HIV-1 RNA 二量体化は、ゲノム組換えの前提条件である。二量体化のためのゲノム上の cis 因子については、*in vitro* 実験系により解析されているが、粒子内二量体化の cis 制御については全く不明である。

当該研究により、粒子内二量体化シグナルの絞り込みが進み、*in vivo* ゲノム二量体化の必要十分領域が世界で初めて明らかにされた。

ゲノム二量体化 trans 制御因子の同定、その制御法立案の手がかりとなる重要知見と考えられる。

### II-3. 複製・変異研究支のための技術開発

1) 感染性分子クローン樹立の効率化（巽）：HIV 感染性分子クローンの効率的樹立法の開発は、HIV 準種の複製・易変異性研究と薬剤効果の最適化に重要である。従来法（*in vitro* クローニング）は時間がかかり過ぎ、PCR を用いた従来法（LTR long PCR 法）は、感染性分子クローン樹立の効率が悪い。

当該研究では、MAGIC-5A 細胞の利用（HIV Trapping 系）と感染細胞プロウイルス DNA 5'-half と 3'-half 増幅（Half & Half 戦略）により、従来法より格段に効率的に感染性分子クローンを樹立する方法を確立した。

HIV 準種の複製・易変異性研究と薬剤効果の最適化に重要な進展となる。

2) 計算科学的手法の検討（仲宗根）：計算科学的手法は HIV 複製・変異調節の理解と新規薬剤開発に重要な働きをしよう。

当該研究では、いち早くその重要性に注目し、ウイルス分子の構造と生物活性の相関関係を調べる目的で、蛋白質構造系統樹解析ソフト（ProCluster）を開発した。

その適用範囲は今後の検証を必要とするが、蛋白質分子機能と進化を立体構造をもとに考えていくための重要な手がかりを提供しよう。

### E. 結論

当該研究により、HIV 複製・変異の理解と人為制御につながる細胞因子、HIV 分子-細胞装置の相互作用、HIV 分子の機能制御領域の新知見が、数多く得られた。これらの成果を発展させることで、HIV 複製・変異の理解向上と新規薬剤開発の進展が期待される。しかし、これを可能とするにはまだ時間を要する。当該研究関連課題（HIV ウイルス学基礎研究）の継続、研究基盤のさらなる活性化（研究人口と研究費の増加）、立体構造解析研究者を中心とする関連研究者との連携が必要と考える。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

業績一覧参照。

### H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願・取得  
間陽子：出願番号 2003-346377、「HIV-Vpr の機能に関する発明」、平成 15 年 10 月 3 日出願。
2. 実用新案登録：なし。
3. その他：なし。

## II. 分担研究報告書

# 1. 細胞膜流動性と HIV-1 の吸着・侵入機構に関する研究

分担研究者 原田信志 熊本大学大学院医学薬学研究部感染防御 教授

**研究要旨** HIV-1 を 37°C で 1 時間細胞に吸着させ、40°C へ 1 時間移行させると、感染の増強 post-attachment enhancement (PAE) が認められた。この PAE は抗 CXCR4 ペプチドである T140 で阻止されることから HIV-1 の multiple-site binding が感染成立に関与していると考えられる。細胞膜の流動性を電子スピンドラベル法で測定すると、温度依存的に脂質二重膜の流動性は亢進した。細胞を Tween20 で処理すると、熱処理と同様に HIV-1 の吸着量は増加し感染性は増強した。しかも、その細胞の膜流動性は亢進した。一方、MT-2 細胞を HLA-II 抗体で処理し HIV-1 を吸着させると、ウイルス吸着量と感染価は低下した。抗体で処理した細胞では細胞膜の流動性は抑制された。細胞膜の流動性、ウイルス吸着量それに感染性は相関関係にあった。

## A. 研究目的

HIV-1 の細胞への吸着は、ウイルス gp120 と細胞表面の CD4 と CXCR4 (あるいは CCR5) との結合ではじまる。1 分子レベルでのその後の gp120 の変化と細胞膜への融合の過程は良く研究されている。しかし、ビリオンと細胞レベルでこの感染を考えると、分子レベルでの過程で、吸着・侵入に至る感染の成立を必ずしも説明できない。

我々は HIV-1 の吸着と侵入には multiple-site binding (MSB) が必要であると仮定した。この MSB には細胞膜とウイルスエンベロープ (両者共、脂質二重膜) の流動性が関与している。このことを証明するため、ウイルス吸着時の温度による感染価の変化を調べた。高温 (40°C) での吸着では HIV-1 感染性の増加が認められた。しかも、HIV-1 を 37°C で 1 時間吸着した後、40°C で 1 時間処理してもこの感染増強は認められた (post-attachment enhancement ; PAE)。この PAE は抗 CXCR4 ペプチドである T140 で完全に阻止されることから、40°C では MSB

の形成が促進されていると考えた。

本研究では、これまでの実験結果をさらに確認するため、温度の移行による細胞膜流動性の変化を測定する。また、温度以外の因子で細胞膜の流動性を修飾するものを追求し、その因子による HIV-1 感染性の影響を検討する。以上の研究により、HIV-1 の吸着と侵入 (つまり感染) に関連している要因を明らかにし、新しい感染制御の方策を探る。

## B. 研究方法

1. 細胞とウイルス : GHOST/CXCR4 細胞、MT-2 細胞、および HIV-1 の持続感染細胞である MOLT-4/C-2 細胞を使用した。ウイルスはルシフェラーゼ遺伝子を有し NL43 の env(X4) で pseudotyping した NL43-luc ウイルスを用いた。
2. 感染価の測定 : GHOST/CXCR4 細胞と NL43-luc ウイルスを使用し、感染後 2 日目にルシフェラーゼ活性を測定した。
3. ウイルス吸着量の測定 : 細胞に吸着した

HIV-1 の定量は p24 抗原を ELISA 法で測定することで行った。

4. 抗体と試薬：抗 HLA-II 抗体を MT-2 細胞に使用した。Detergent である Tween20 は細胞毒性が認められなかった 0.05% で用いた。

5. 細胞膜流動性の測定：5-doxy stearic acid と細胞を室温で 20 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄した。その後、細胞膜に取り込まれた 5-doxy stearic acid の動きを電子スピラベル(ESR)法で解析した。細胞膜の流動性は ESR の波形により order parameter (S) として算出した。

$$S = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / 27.3 G$$

(倫理面での配慮はこの研究では必要ない)

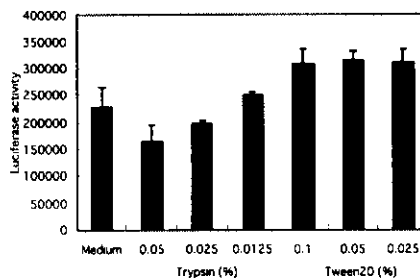
### C. 研究結果

1. GHOST/CXCR4 細胞の膜流動性の測定：細胞を 5-doxy stearic acid でスピラベルし細胞膜の流動性を測定した。37°C での S 値は 0.607 であり、40°C では 0.583 であった (図 1C)。S 値の低下は GHOST/CXCR4 細胞の 40°C での流動性の増加を示していた。

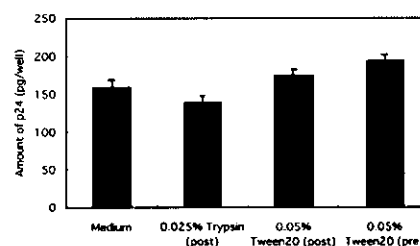
2. Detergent による HIV-1 感染性の亢進：細胞膜に影響を与え、HIV-1 の感染を修飾する因子をスクリーニングするため、最も簡便なルシフェラーゼアッセイを用いた。細胞毒性を示さない濃度の Tween20、Brig35、Triton X-100、NP-40 で細胞を 2 分間処理し、HIV-1 を 37°C で 1 時間吸着させ、感染性の変化を調べた。いずれの detergent も感染価が上昇した。最も再現性のある Tween20 でさらに実験を行った。Tween20 の細胞処理による感染増強は、ウイルスの吸着前だけでなく、吸着後でも認められた (図 1A)。また、感染の増強と同じように HIV-1 の吸着量も増加した (図 1B)。この Tween20 による細胞膜の流動性へ与える影響を調べた。Tween20 (0.05%) は膜の流動性を亢進させ

た (図 1C)。

A Post-treatment effect of trypsin and Tween20 on viral infectivity



B Effect of trypsin and Tween20 on viral adsorption



C Effect of temperature and Tween20 on membrane fluidity of GHOST/CXCR4 cells

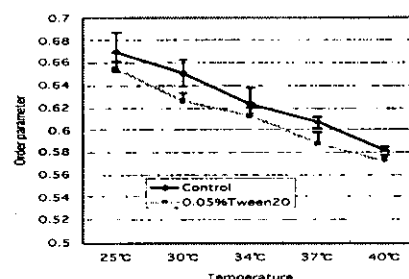


図 1 Tween20 の HIV-1 感染と膜流動性への作用

3. 抗 HLA-II 抗体による HIV-1 感染の抑制：MT-2 細胞は多くの HLA-II 分子を細胞表面に発現している。MT-2 細胞を予め抗 HLA-II 抗体で処理し、HIV-1 を 37°C で 1 時間吸着させた。HIV-1 の感染価と吸着量は共に抗体量に比例し抑制された (図 2A)。さらに、抗 HLA-II 抗体は MT-2 細胞の膜流動性を低下させた (図 2B)。

### D. 考察

細胞膜の流動性は 37°C と 40°C で有意の差で変化していた。この流動性の差により multiple-site binding (MSB) が説明され、それが 40°C における感染増強 (PAE) の機序であ

ると考えた。

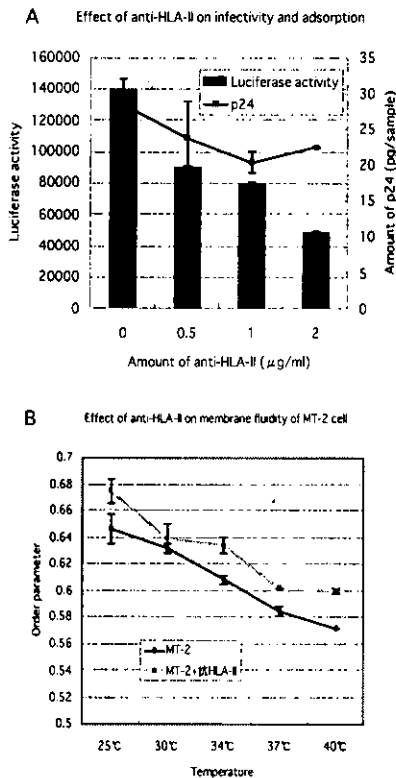


図2 抗 HLA-II 抗体の HIV-1 感染と膜流動性への作用

Tween20 は HIV-1 の感染価と吸着量を増加させた。また、細胞膜の流動性も亢進した。反対に、抗 HLA-II 抗体は HIV-1 の感染価と吸着量を減少させ、膜流動性を抑制した。この温度以外の因子による HIV-1 の感染価・吸着量の修飾と膜流動性の変化の相関は、さらに膜の流動性が MSB 形成に深く関連していることを示している。

この MSB は、HIV-1 エンベロープと細胞膜レセプターとの分子間結合のさらなる集合を意味しており、HIV-1 のコアが細胞内に侵入するのに充分大きい fusion pore を形成するのに重要だと考えられる。

細胞膜の流動性を抑制することにより、HIV-1 の感染を制御することができる。このことは、今後、同様な方法で HIV-1 の感染を抑制することが出来る可能性を強く示唆している。

## E. 結論

細胞膜の流動性は HIV-1 の gp120/レセプターの集合 multiple-site binding(MSB)に重要であると考えた。この MSB は温度だけでなく、Tween20 や抗 HLA-II 抗体で制御可能であった。今後、細胞膜の流動性を抑制し HIV-1 の感染を阻害する方策を探る必要がある。抗 HLA-II 抗体は、エンベロープに HLA-II 抗原を有する HIV-1 ビリオンを中和する。従って、ある種の中和抗体は、抗 HLA-II 抗体が細胞膜の流動性を抑制するのと同様に、HIV-1 エンベロープの流動性を抑制することにより (MSB を阻止し) 中和能を発揮するものと思われる。

## F. 健康危険情報

該当事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Tominaga, M., K. Kumagai, and S. Harada. 2003. Effect of electrical stimulation on HIV-1-infected HeLa cells cultured on an electrode surface. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61:447-450.
- 2) Maeda, Y., K. Yusa, and S. Harada. 2003. Enhanced infectivity of HIV-1 by X4 HIV-1 coinfection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308:906-913.
- 3) Song, W., Y. Maeda, A. Tempaku, S. Harada, and K. Yusa. 2003. Persistence of mutations during replication of an HIV library containing combinations of selected protease mutations. *Antiviral Res.* In press.

### 2. 学会発表

- 1) 原田信志、前田洋助、遊佐敬介；V3 抗体と CXCR4 antagonist による HIV-1 の multiple-site binding の阻止、第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年 10 月、京都。



2) 遊佐敬介、前田洋助、門出和精、原田信志；プロテアーゼ阻害剤治療感染者由来 HIV-1 プロテアーゼライブラリーの作製、第 51 回日本ウイルス学会総会、2003 年 10 月、京都。

3) 原田信志、前田洋助、遊佐敬介；細胞膜流動性の亢進による HIV-1 感染の増強、第 17 回日本エイズ学会総会、2003 年 11

月、神戸。

4) 前田洋助、遊佐敬介、原田信志；R5X4 HIV の CXCR4 アンタゴニスト感受性の検討、第 17 回日本エイズ学会総会、2003 年 11 月、神戸。

H. 知的財産権の出願・登録状況  
該当事項なし。

2. 膜融合に対する HIV-1 gp41 膜貫通領域の寄与—融合後期過程への寄与

分担研究者 松田善衛 国立感染症研究所エイズ研究センター

研究要旨：gp41 の膜貫通領域には膜タンパク質ヘリックス間相互作用に寄与すると仮定される GxxxG（G：グリシン、x：任意のアミノ酸）モチーフが保存されている。同様のモチーフについては VSV-G においてはそのグリシン残基の変異により膜融合能が顕著に低下することが報告されている。我々の解析では HIV-1 では VSV-G とは異なり、グリシン残基の他のアミノ酸への置換でも膜融合能に大きな影響を与えず、HIV-1 膜貫通部分の変異に対する許容度の高さが示唆された。しかし gp41 膜貫通領域全体を GpA（GxxxG モチーフをもつ）の相当部分と置換すると、融合能の著明な低下をみた。このメカニズムを解明するため、さらに HIV-1 膜貫通部を VSV-G のそれと置換した変異体を加え、二つの変異体が膜融合のどのステップで障害を来しているのかを解析した。両置換体ともに COS 細胞での Env の発現、ウイルスへの取込みは野生型と同様であったが、T 細胞株での増殖能は欠いていた。膜融合各過程の解析では、lipid mixing および cytosol mixing は観察され、fusion pore の形成段階までは進行していることが確認された。以上のことから gp41 膜貫通領域は fusion pore の拡大または安定化などの膜融合後期過程において重要な役割を担っていることが示唆された。

A 研究目的

HIV-1 のトランスメンブレンタンパク質（TM、gp41）は感染の際のウイルス-細胞間膜融合に重要な役割を果たしている。近年その細胞外部分の機能—構造関連が明らかにされ、同部分は gp120—CD4/CXCR4(CCR5) 相互作用の後 pre-hairpin form から 6 本のヘリックス束からなる hairpin form へ構造変化を遂げると考えられており、それに伴ってウイルス、細胞膜が近接すると考えられている。しかし膜融合は gp41 細胞外成分だけでは達成されず、膜融合の分子機構は未だ完全には理解されていない。我々

はウイルス増殖過程のうち特に膜融合における gp41 膜貫通部分の役割を明らかにする目的で本研究を行った。昨年度、gp41 膜貫通部分に存在する GXXXG モチーフについての変異体の解析から、膜貫通部分の変異に対して比較的高い許容性を持つが、同部分全体の置換では膜融合能が著明に低下することを明らかにした。本年度は膜貫通部分を GpA あるいは VSV-G の相当部分と置換した変異体についてその膜融合能の低下の機構を明らかにすることを目的に膜融合の各ステップを解析する実験を行った。

## B 研究方法

Env タンパク質の tm 部分を GpA あるいは VSV-G の tm で置換した変異体を作成しその機能解析を行った。GpA についてはその 2 量体形成能を欠失した変異体 G83I も解析に加えた。それぞれの変異体についてプロウイルス DNA を COS 細胞にトランスフェクションし、発現したタンパク質を細胞、ウイルス分画についてウエスタンブロッティング法により解析した。細胞内における変異 Env タンパク質の分布を抗 gp120Mab による免疫蛍光抗体法で、変異 Env タンパク質の CD4 結合能を CD4 との免疫共沈によって測定した。変異 Env による細胞膜融合の各段階を lipid mixing, 細胞質交流を融合に際しての細胞から細胞への転写因子のトランスファーアッセイにより検討した。

## C 研究結果

MAGI cell を用いたアッセイでは膜貫通部分を GpA あるいは VSV-G で置換した変異体は融合能の著明な低下を認めた。COS 細胞でのタンパク発現評価では、その発現、細胞内分布、ウイルスへの取り込みなどに大きな障害を認めなかった (data not shown)。また発現 Env のうち gp120 の CD4 結合能の変化を吟味する目的で細胞において変異体 Env と CD4 を発現させ抗 CD4 抗体で免疫沈降を行ったところ、野生型と変異体では沈降 gp120 の量に大きな変化を認めなかった。すなわち膜貫通部分変異 Env の CD4 結合能に大きな変化は認められなかった (図 1)。次に

膜融合の各ステップの解析を行った。この目的では CD4 陽性 T 細胞 H9 と Env 発現 COS 細胞間での膜融合を実験系として用いた。まず蛍光色素で H9 の細胞膜および細胞質をそれぞれラベルした後 Env 発現標的細胞との共培養を行い融合を開始させ各色素の COS 細胞への移行を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。その結果 GpA, VSV-G 置換体においてもその頻度は野生型に比べて低いものの両色素の H9 から COS 細胞への移行はみられた (data not shown)。またより定量的評価を行うため CD4 と転写活性化因子 (EBNA-VP16) を 293T 細胞に、Env 発現ベクターおよび EBV プロモーターに導かれるリポーター遺伝子を COS 細胞にそれぞれ導入後、両細胞を共培養したところ、野生型よりは低値ではあるが GpA, VSV-G 置換体でもレポーター遺伝子の発現が認められた (図 2)。

## D 考察

TM の膜貫通部分 (tm) 置換変異体 (GpA, VSV-G) においては、Env タンパク質発現、細胞内分布、ウイルス粒子上への取り込み、CD4 結合能などには顕著な影響が認められなかった。一方細胞間融合能においては野生型に比べて著明な低下が認められた。しかし、膜脂質、細胞質内容の混合を指標とした膜融合ステップの解析では野生型に比較してその頻度は低下しているものの、細胞質の交流が認められ、これらの変異体においても膜融合孔の形成は起きていることが示唆された。従っ

てこれらの置換変異体における融合能の低下は膜融合孔形成以後の過程における障害に起因している可能性が示唆された。これらの gp41 膜貫通部分置換体の解析結果から、gp41 膜貫通部分は膜融合の際に融合孔形成後の後期過程に機能を果たしている可能性が示唆される。以上の結果から膜融合が正常に起きるためには gp41 の膜貫通部分の特定の amino 酸配列に基づいた特定の構造の存在が必要であることが推測され、CD22 膜貫通部分置換体で gp41 機能に大きな障害が認められなかったという実験事実に基づいた結論、すなわち機能的 gp41 にとってその膜貫通部分に特定の構造は必要でないとする考えは訂正されるべきである。

#### E 結論

gp41 を介した融合能はその膜貫通部分を GXXXG モチーフが保存された GpA あるいは VSV-G 膜貫通部分と置換することによって膜融合過程の後期過程において顕著に阻害されることがわかった。すなわち gp41 膜貫通部分は GXXXG モチーフに加えて gp41 特異的な何らかの構造が存在しないとその機能を果たすことができないことが明らかとなった。これらの結果から gp41 の細胞外部分は N 末から C 末に向かって膜融合の経時的各過程に従って各サブドメインが配置されていることが示唆された (図3)。

#### F 健康危険情報

該当なし

#### G 研究発表

##### 1) 論文発表

Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H., Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A., Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., Ariyoshi, K.: Impaired Processing and Presentation of Cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) Epitopes Are Major Escape Mechanisms from CTL Immune Pressure in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection J. Virol. 78 in press

##### 2) 学会発表

1. Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Yoshiyuki Yokomaku and Zene Matsuda  
The role of the membrane spanning domain of HIV-1 TM in membrane fusion. Retroviruses Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, USA. May 20-25, 2003

2. 駒野淳、宮内浩典、松田善衛、山本直樹 ヒト免疫不全ウイルス感染の初期過程における Arp2/3 複合体の重要性 第51回日本ウイルス学会2003年10月27日-29日、京都

3. 宮内浩典、駒野淳、松田善衛 膜融合に対する HIV-1gp41 膜貫通領域の寄与-融合後期過程への寄与 第51回日本ウイルス学会2003年10月27日-29日、京都

4. 杉浦互、Lay Myint、駒野淳、松田昌和、松田善衛、西澤雅子 薬剤耐性 HIV-1 における粒子形成過程の形態学的解析 第51回日本ウイルス学会2003年10月27日-29日、京都

5. 横幕能行、ジラワン シーサワット、ブサラワン シーワンタナ、松田善衛、有吉紅也 タイ流行臨床検体由来 gag-pol 発現 CTL 標的細胞パネル作成の試み 第51回日本ウイルス学会2003年10月27日-29日、京都