

6. 清水佐紀、吉仲由之、木村竜一郎、宮内浩典、駒野淳、松田善衛、山本直樹
HIV-1 慢性感染細胞におけるプロテオーム解析 第51回日本ウイルス学会2003年10月27日-29日、京都10月

7. 駒野淳、宮内浩典、松田善衛、山本直樹 : ウイルス感染初期過程におけるArp2/3複合体の重要性, 第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月10-13日

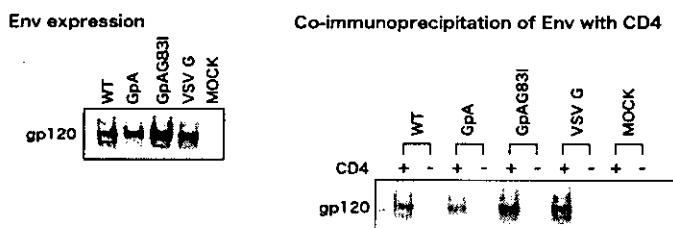
8. 宮内浩典、駒野淳、松田善衛: HIV-1エンベロープタンパク質膜貫通領域(membrane spanning domain, MSD)の膜融合後期過程への寄与, 第26回日本分子生物学会年会、神戸、2003年12月10-13日

9. 横幕能行、松田善衛、千葉智子、巖馬華、松田昌和、杉浦互: 抗HIV-1新規候補薬剤検索のための多検体処理可能なスクリーニングシステム構築 第17回日本エイズ学会、神戸2003年11月27-29日

H知的所有権の取得状況

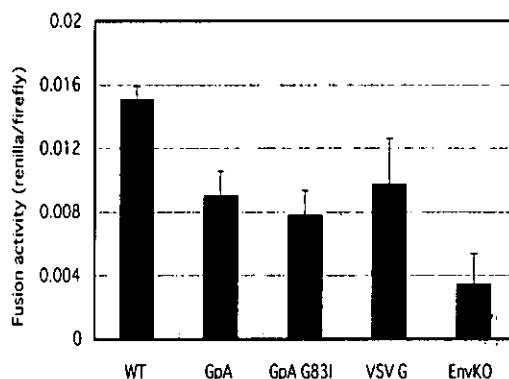
該当なし

図1 変異 Env の発現と CD4 との免疫共沈



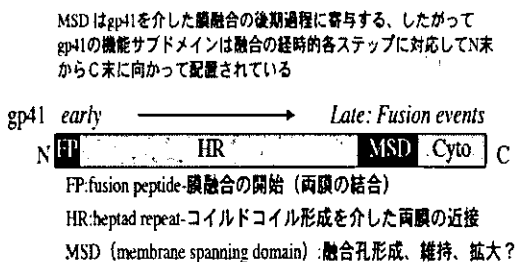
変異体 Env および CD4 を発現後、抗 CD4 抗体で免疫沈降を行い回収されたタンパク質を抗 gp120 抗体で検出した結果を示す。WT(野生型)、その他の変異体は tm 部を置き換えたタンパク名で記載。G83I は2量体形成能を欠く GpA。

図2 転写活性化因子の細胞間移行を指標とした細胞融合能の評価



H9細胞に EBNA-VPI6 を COS 細胞に Env および EBV プロモーターに導かれるリポーター遺伝子(レニラルシフェラーゼ)を導入し膜融合に際したリポーター遺伝子の活性化を指標として融合を評価した。Env の発現量は Env 発現ベクター上に存在する蛍光シフェラーゼの値で補正した。

図3 gp41 細胞外部分の構造・機能関連



3. Gp120 のトロンビンによる活性化

服部俊夫 東北大学大学院医学系研究科感染症態学分野 教授
研究協力者 凌虹 宇佐美修 肖鵬

研究要旨

炎症組織でのトロンビンを含むプロテアーゼによる感染促進作用を明らかにするために、H9/IIIB 細胞を種々のプロテアーゼで処理して、gp120/41 の機能エピトープの発現を FACS で解析した。その中でトロンビンは V3 の反応性を減少させるとともに gp120 の補受容体結合部位、CD4 結合部位及び gp41 の中和エピトープの反応性も増加させた。H9/IIIB 細胞と MAGI 細胞の融合をもトロンビンは促進させた。これらのことは血中の炎症由来分子であるトロンビンは gp120 を活性化させることにより HIV の感染を促進させたと思われる。

A. 研究目的

HIV が標的細胞に感染する際には gp120 が 2 つの受容体に結合する必要がある。その結合の際には Envelope 蛋白の立体構造変化が生ずる。立体構造変化の引き金になる機構は不明な点が多いが、V2/V3 interaction になんらかの変化をもたらすことが重要である。ここでは V3 ループに作用すると思われる種々のセリン・プロテアーゼを用いて gp120 の活性化能を比較・検討した。中でも血中に存在するプロテアーゼであるトロンビンが、gp120 を活性化させ、感染を促進する可能性が認められた。

B. 材料・方法

細胞とモノクロナル抗体: LAI 株に感染している H9/IIIB とその非感染細胞、H9 及び MAGI 細胞 (HeLa-CD4-LTR-beta GAL) を用いた。使用したモノクロナル抗体は表 1 に示した。

プロテアーゼ: トリプシン、キモトリプシン、トロンピンはシグマから、カテプシン G は NCI Biomedicals から購入した。H9/IIIB 細胞を種々濃度のプロテアーゼに 37°C で反応させた。その後に種々の抗体と反応さ

せ、結合した抗体は、FITC 結合第 2 抗体で検出した。

MAGI 細胞を用いた融合測定: 一晚培養した MAGI 細胞に感染細胞を添加し 20 時間培養する。融合により生じた多核の巨細胞は Sigma 社の X-gal を用いて検出する。感染細胞を種々の濃度のプロテアーゼで処理したのちに融合をさせることにより、プロテアーゼの影響をみる事ができる。

C 研究結果

ウイルス膜蛋白に対するセリンプロテアーゼの多様な作用。図 1 に示すように、プロテアーゼの感染細胞膜存在する Envelope 蛋白の各種エピトープに対する作用は多様である。トリプシンは V3 ループに対する殆どのモノクロナル抗体、V2 ループ、gp41 エピトープの発現を低下させたが、CD3、CXCR4 発現に影響はなかった。(U87,HOS) にもみられた。

キモトリプシン、カテプシン G の影響は総じて低かった。トロンピンは V3 のチップに対する抗体の反応性は低下させたが、他の V3 エピトープに対する抗体反応には変化を与えなかった。しかし 17b, F105 に対

する反応性は上昇させた。

プロテアーゼの感染に及ぼす影響：H9/IIIB細胞とMAGI細胞の融合の過程に及ぼすプロテアーゼの影響を観察した。トリプシンとトロンビンについて検討を加えた。トリプシン処理によりF105の発現増強がみられたが、感染増強作用はなかった。トロンビンで処理した際はV3ループへの影響は殆どみられず、447-52D発現のごく僅かな減少を認めた。それに伴い、F105と17bエピトープの発現増強がみられた。一方で細胞融合はトロンビンの添加により用量依存性に増加した。

D. 考察

以上の実験によりHIV-1に感染している細胞に存在しているgp120/41の機能的エピトープの発現に関するセリンプロテアーゼの影響を観察した。ここでは消化管と血清由来のそれぞれの代表的プロテアーゼであるトリプシンとトロンビンを選び検索した。既にトロンビンがGPGRAFのR基を切断することは知られている。ここではトロンビンが特異的にV3ループに反応するモノクロナル抗体の反応性を減少させた。さらにgp120のCD4や補受容体結合部位に対する反応性も上昇させている。これはおそらくトロンビンによる特異的なV3ループの切断による現象であろうと思われる。一方でトリプシンは切断活性は認められるものの感染促進作用は確認できなかった。トロンビンによるV3ループの切断は1箇所、トリプシンによる切断は7箇所が認められている。これらよりgp120の活性化をもたらすV3の切断は特異的である必要があることが示唆された。最近の研究ではトロンビンは炎症分子としてRANTES, IL-6, MCP-1の産生を誘導することが知られている。そして炎症分子に遊走や、マクロファージ

の接着誘導にも促進作用を有することが明らかになった。またこれらの炎症の存在は性病によるHIVの感染促進作用にも知られていてその現象にかかわるトロンビンの役割の研究も重要である。

E. 結論

HIVの感染にはgp120とgp41の立体構造変化が関与する。そのきっかけとなるのはV3ループを介した種々のEventが予想される。ここではV3ループを1箇所だけ切断する炎症分子のトロンビンには感染促進効果とgp120の活性化が伴っていた。このことより、gp120の活性化にはV3ループの限定的な立体構造が必要であることが示唆された。そしてその活性化は組織に存在する炎症により促進される。

G. 研究発表

論文発表

1. **Lng H, Usami O, Xiao O, Hattori T.:** 2003. The N-terminal of the V3 loop in HIV-1 gp120 is responsible for its conformation-dependent interaction with cell surface molecules(s). *Aids Res. Hum. Retrovir.* In press
2. **Sano K, Shirota H, Terui T, Hattori T, and Tamura G.:** 2003 Oligodeoxynucleotides without CpG Motifs Work as Adjuvant for the Induction of Th2 Differentiation in a Sequence-Independent Manner. *J. Immunol.* 170:2367-73.
3. **Nishimaki K, Okada S, Miyamura K, Ohno I, Ashino Y, Sugawara T, Kondo T and Hattori T.:** 2003 The possible involvement of human herpesvirus type6 in obliterative bronchiolitis after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 32:1103-1105.
4. **服部俊夫、凌 虹、岡田信司、芦野有梧、宇佐美修:** 2003 免疫再構築症候群 日

本エイズ学会誌 Vol.5 33-41,

5. 服部俊夫 2002 Immunobiology of HIV infection. ウイルス. 52 : :245-9.

学会発表

1. 凌虹、宇佐美修、服部俊夫 V3 ループの細胞膜への結合は立体構造依存的でN端が関与する。第51回 日本ウイルス学会 京都 2003年10月27-29日
2. 北室知巳、服部俊夫、三木祐、菊池喜博、佐藤功、三浦元彦：HIV 感染者に合併した カリニ肺炎の治療に関する検討 第17回日本エイズ学会学術集会、神戸、2003年11月27-29日
3. Ling H, Usami O, Hattori T.: The N-terminal of HIV-1 gp120 V3 loop may be responsible for its conformation-dependent interactions with cell surface molecules(s). 2003 Keystone Symposia HIV vaccine development: Banff, March 29-April 4, 2003

Table 1

Monoclonal antibodies used in the study

MAb	Core epitope
Anti-gp120	
Anti-V3 loop	
447-52D	GPGR
694-98D	GPGRAF
902	^a NT
IIIB-V3-21	INCTRN
Anti-coreceptor BS	
17b	Discontinuous
Anti-CD4 BS	
F105	Discontinuous
Anti-V2 loop	
830A	Conformational
2158	Conformational
Anti-gp41	
2F5	ELDKWA
246D	LLGI
98.6	Conformational (aa 644-663)
50.69	Conformational (aa 579-613)
12G5	Human CXCR4
	Discontinuous
CD3	Human CD3,
	Discontinuous

^a NT: not tested.

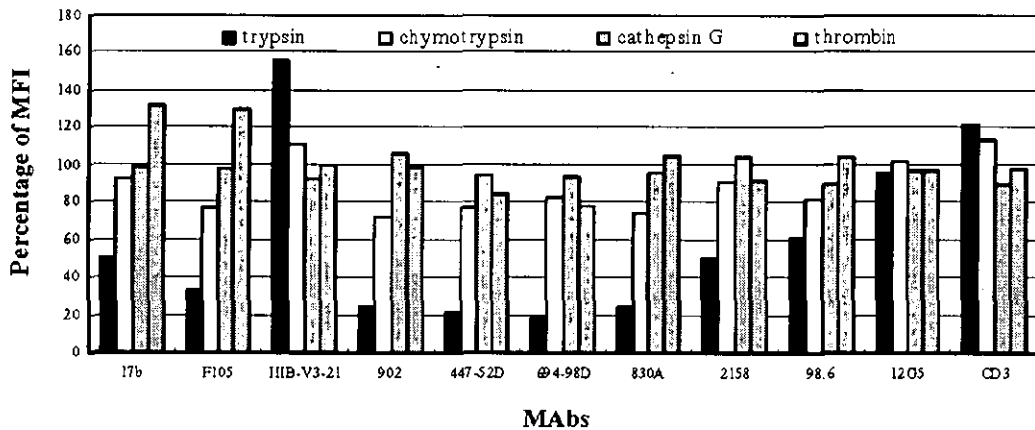


Fig. 1 Effect of the proteases on the bindings of MAbs to H9/IIIB cells.

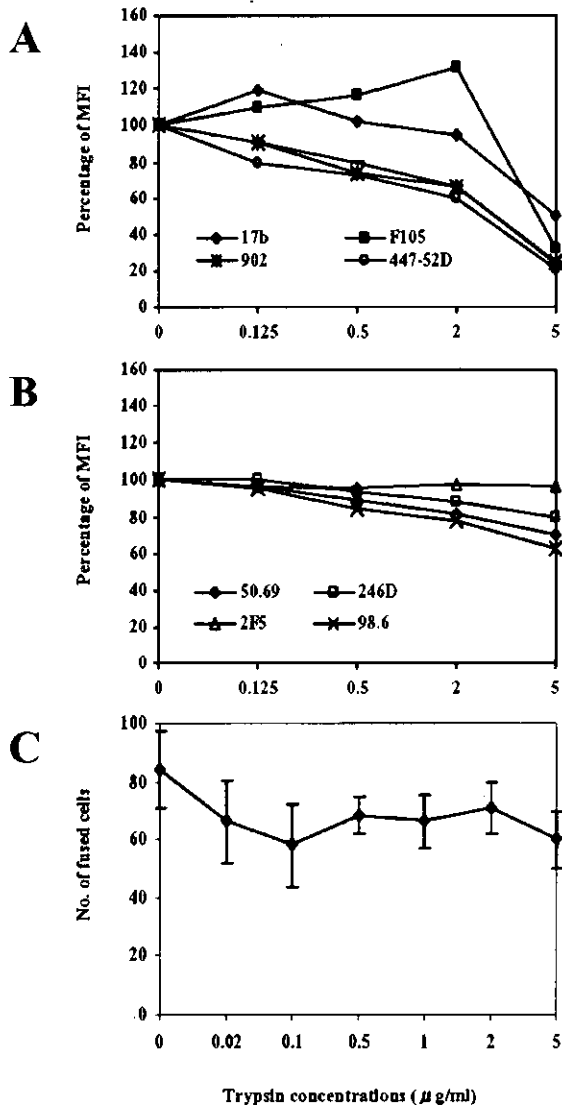


Fig. 2 Effect of trypsin on the bindings of MAbs and on cell to cell fusion. In A (MAbs to gp120) and B (MAbs to gp41), the effects were expressed as percent of MFI of H9/IIIB cells treated with trypsin comparing with MAb staining alone. MFIs of MAbs alone were essentially similar as written in legend for Fig. 1. (C): The numbers of fused cells from 6 wells (mean +/- Standard Deviation) at one concentration of two experiments from three different experiments with similar results are shown.

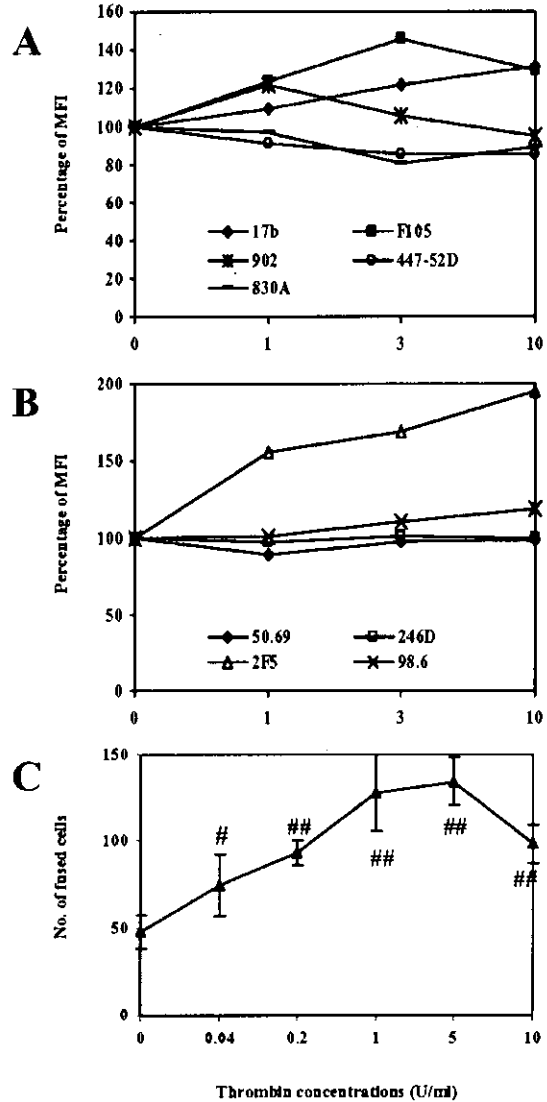


Fig. 3 Effect of thrombin on the binding of MAbs and on cell to cell fusion. The results are expressed in the identical ways with legend for Fig.2. #, $p < 0.05$; ##, $p < 0.001$.

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

4. 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

分担研究者 田代 啓 京大・遺伝子実験施設・助教授

研究要旨

SDF-1 は、補助受容体 CXCR4 の生理的リガンドである。我々はこれまでにエイズ患者血中 SDF-1 濃度程度の SDF-1 が CD4 細胞上の CXCR4 発現量を制御し得ることを世界で初めて動物体内で実験的に示している。本研究は、1. HIV-1 感染症における血中 SDF-1 濃度の診断的価値について研究を行うとともに、2. HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物について検討をして、以下のように実験して重要な結果を得たので報告する。1. については、現在、A、B 2つの方向で実験を行っている。1.-A 我々の SDF-1 測定法に最適化した採血方法で新たに、共同研究者である米国 NCI の S. O'Brien 博士らのグループが米国のコホートから採血した HIV-1 感染者の血液中の SDF-1 量を測定し、血中 SDF-1 量と従来の CD4 細胞数や血中 viral load では予測し得ない「エイズ随伴症候群出現」と「患者体内での HIV ウイルスの指向性変化」等のパラメーターとの相関の有無を検討中である。1.-B 山梨医大・照沼博士と共同で、LTNP 試料とアフリカ・ザンビアの未治療者試料を用いて検討中である。本年度、これまでヒト血中濃度の測定が技術的困難により不可能であった IL-2、IL-4、IL-8、IL-10、MCP-1、Eotaxin、GM-CSF、TGF- β 1、INF- γ について、正確な血中濃度測定を可能とする、ランタノイド金属ユーロピウムを用いる方法を樹立して、HIV 感染症との相関を検討し、SDF-1 の他 2つのサイトカインでも有意差を見出した。2. については、小分子化合物と gp120 の結合様式を、BIAcore2000 とコンフォーカル単一分子追跡法により検討し、X4 ウイルスと R5 ウイルスの両方の増殖阻害するメカニズムは、gp120 への結合によることを強く示唆するデータを得た。

A. 研究目的

エイズ対策の医療と行政に寄与するための HIV 感染症の理解と制御には、細胞表面の吸着の制御の理解が重要である。本研究では、1. HIV-1 感染症における血中 SDF-1 濃度の診断的価値について研究

を行うとともに、2. HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物について検討することを目的とした。
1.-A HIV-1 感染症における血中 SDF-1 濃度の診断的価値についての研究では、従来の CD4 細胞数や血中 viral load では

予測し得ない「エイズ随伴症候群出現」と「患者体内での HIV ウイルスの指向性変化」等のパラメーターとの相関の有無を検討することを目的とした。1.-B 山梨医大・照沼博士と共同で、LTNP 試料とアフリカ・ザンビアの未治療者試料を用いて検討することを目的とする。本年度は、これまでヒト血中濃度の測定が技術的困難により不可能であった IL-2、IL-4、IL-8、IL-10、MCP-1、Eotaxin、GM-CSF、TGF- β 1、INF- γ について、正確な濃度測定を可能とする、ランタノイド金属ユーロピウムを用いる方法を樹立した上で、HIV 感染症との相関を検討することを目的とする。2. HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物についての研究では、gp120 と soluble CD4 との結合を小分子量化合物が阻害する *in vitro* 実験系の確立を目的とした。

B. 研究方法

1.-A の HIV-1 感染症における血中 SDF-1 濃度の診断的価値についての研究では、我々の SDF-1 測定法に最適化した採血方法で新たに、共同研究者である米国 NCI の S. O'Brien 博士らのグループが米国で採血した HIV-1 感染者の血液中の SDF-1 量を測定した。1.-B では、SDF-1 に加えて、IL-2、IL-4、IL-8、IL-10、MCP-1、Eotaxin、GM-CSF、TGF- β 1、INF- γ について、正確な濃度測定を可能とする、ランタノイド金属ユーロピウムを用いる測定方法を樹立した。次いで、血中各サイ

トカイン濃度と LTNP サンプルと未治療サンプルとの相関を検討した。2 の HIV ウイルスの細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物についての研究では、BIAcore とコンフォーカール分子追跡法により、gp120 との結合様式を検討した。BIAcore では、固相化した IIIB の gp120 と soluble CD4 との結合を様々な濃度の小分子量化合物またはポジティブコントロールの抗 gp120 抗体がどの程度阻害するかを示す濃度依存実験を行った。

<倫理面への配慮>

インフォームドコンセントをとり、匿名化を行い、日米両方の研究機関の倫理委員会の審査を経て承認を得てその指針に従って研究を行った。

C. 研究結果

研究目的 1.-A については、試料の測定をすすめた。共同研究者である米国 NCI の S. O'Brien 博士らは、充分大規模な数の測定を終えてから統計解析する研究スタイルなので、測定途上にある現時点では統計解析を行っていない。1.-B については、2種のサイトカインについて、HIV 感染群と非感染群でプレリミナリーではあるが有意差を見出してさらに検討中である。2については、小分子量化合物の gp120 に対する結合を BIAcore と、コンフォーカール分子追跡法により確認した。図1に示すように、BIAcore では、固相化した IIIB の gp120 と 10microg/ml の soluble CD4 との結合を様々な濃度の

小分子量化合物またはポジティブコントロールの抗 gp120 抗体がどの程度阻害するかを示す濃度依存実験を行った。25microM の小分子量化合物は、30microg/ml の抗 gp120 抗体による阻害効果を上回る阻止を示した。

D. 考察

1 については、十分な試料数の測定を終えた時点で統計解析して結論を得ることができる。2 については、*in vitro* 感染実験により、新規小分子量化合物が、X4 指向性ウイルスと R5 指向性ウイルスの両方のウイルス増殖を阻害することから、a. CXCR4 と CCR5 の両方に結合している可能性と、b. CD4 に結合している可能性と、c. gp120 などウイルス側に結合している可能性がある。BIAcore とコンフォーカル 1 分子追跡法により、gp120 への結合が吸着阻害に寄与していることが示されたが、上記の他の可能性を完全に排除するには至っていない。今後の興味深い検討課題である。

E. 結論

1.-A の HIV-1 感染症における血中 SDF-1 濃度の診断的価値についての研究では、順調に試料中の SDF-1 濃度測定を進めた。SDF-1 に加えて、IL-2、IL-4、IL-8、IL-10、MCP-1、Eotaxin、GM-CSF、TGF- β 1、INF- γ について、正確な濃度測定を可能とする、ランタノイド金属ユーロピウムを用いる測定方法を樹立した。2 の HIV ウイルス

の細胞への吸着を阻害する新規小分子量化合物についての研究では、gp120 に対する結合を BIAcore と、コンフォーカル 1 分子追跡法により確認した。

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 なし

H. 知的所有権の取得状況

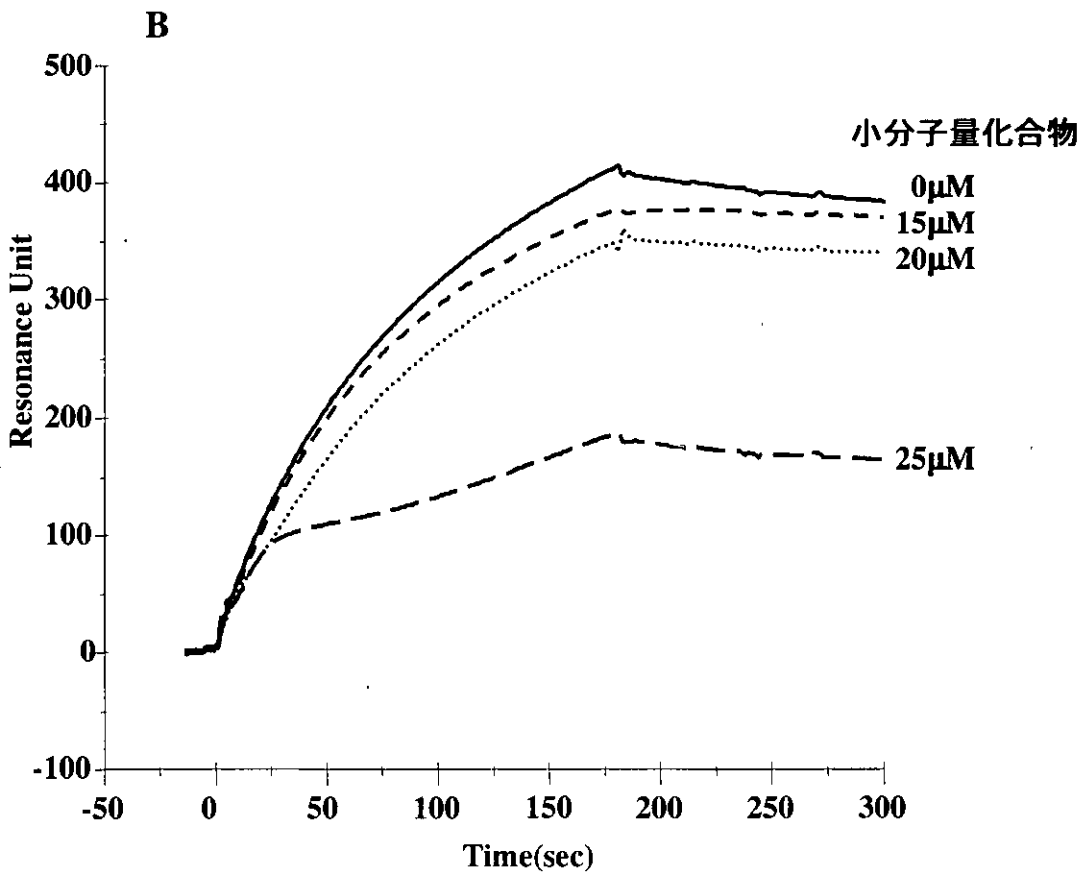
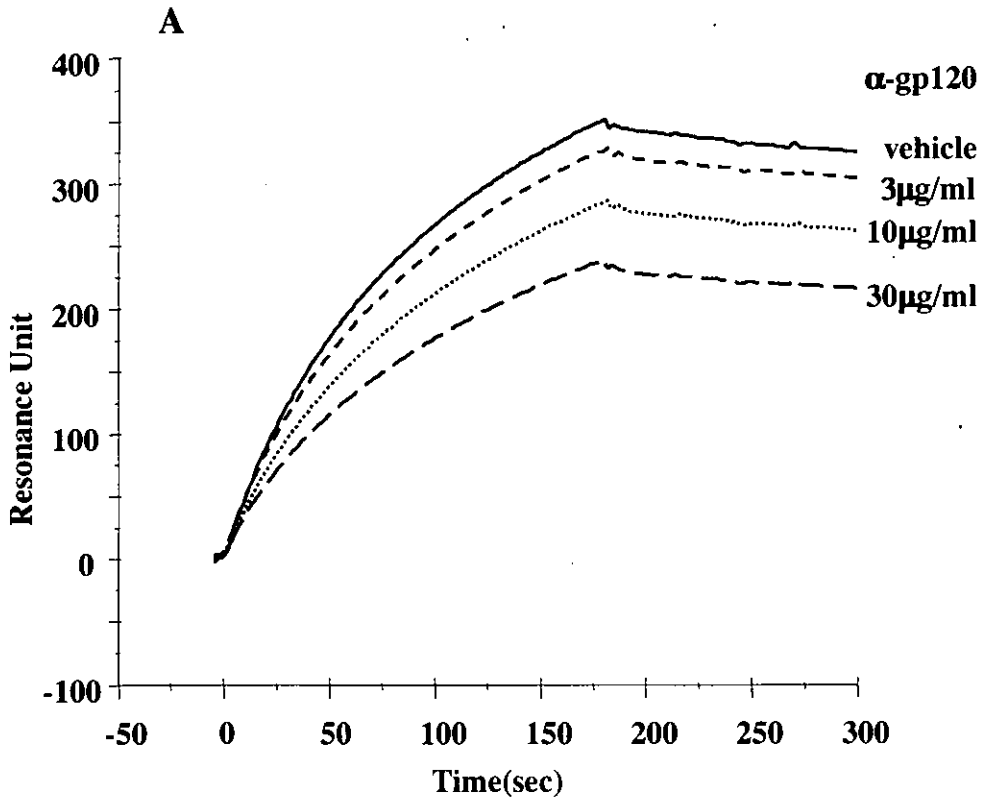
1.特許取得 なし

2.実用新案登録 なし

3.その他 なし

次ページの図の説明

BIAcore 2000 で、固相化した IIIB の gp120 と 10microg/ml の soluble CD4 との結合を様々な濃度の小分子量化合物(B)またはポジティブコントロールの抗 gp120 抗体(A)が、どの程度阻害するかを示す濃度依存実験を行った。25microM の小分子量化合物は、30microg/ml の抗 gp120 抗体による阻害効果を上回る阻止を示した。



厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究）
分担研究報告書

5. HIV侵入過程を再現する無細胞系作製の試み

分担研究者 小島 朝人 国立感染症研究所・感染病理部・室長

研究要旨：HIVはEnvとリセプターとの結合・膜融合・脱殻を経て感染するが、侵入効率に関与するウイルス/細胞因子・機構の詳細は未だ不明である。しかも、細胞培養系の持つ限界ゆえに侵入素過程の解析は困難である。本研究では、侵入素過程をin vitroで解析可能な無細胞系の作製を試みてきた。本年度はこの無細胞系が、①endocytosisによる非特異的侵入ではなく、②Envとreceptorの結合を介する特異的侵入を、③X4 HIV/R5 HIV特異的に検出でき、④侵入阻止剤 SDF-1 α 、MIP-1 β の阻害効果の強弱を識別できる、ことを示した。

A. 研究目的

HIV は Env と細胞膜リセプターとの結合・融合・脱殻を経て細胞に侵入する。HIV 侵入解析系はこれまで細胞培養系が用いられていたため、ウイルスの吸着・侵入・脱殻の各素過程、及び、これに関与する細胞内因子・機構等の解析を困難にしていた。そこで本研究では、HIV 侵入過程を再現できる無細胞系の確立を試み、精製 HIV ビリオンと精製細胞膜画分とのインキュベーションで、HIV から遊離するコア蛋白 p24 を反応上清中に検出できる in vitro 系を報告してきた。本年度は、VSV-G 偽ビリオン、Env 欠損 HIV、CD4⁻ 或いは CCR5^{+/+} 細胞膜画分、HIV 侵入阻止剤等を用いて、この無細胞反応系が HIV 吸着・融合・脱殻の各侵入素過程をどこまで再現できているか検討を加えた。

B. 研究方法

細胞ホモジェネートをPercollに積層して既に報告した方法で膜画分を精製した。精製度は、細胞質LDH活性の測定と細胞膜画分中のGb膜蛋白のウエスタンブロットで判定した。X4 HIVのNL432とR5 HIVのJRFLは既に報告した方法で感染性ビリオンを精製した。偽HIVビリオンはVSV-G発

現ベクターとEnv欠損NL432をコトランスフェクトした293T細胞培養上清から同様に精製した。これら精製ビリオンの感染性はMAGIC5細胞を用いたMAGIアッセイで測定した。無細胞HIV侵入反応は精製細胞膜画分と、精製HIVビリオンを混合後、37°Cでインキュベートした。反応液から超遠心で未反応HIV粒子・膜画分を除去し、上清中の遊離p24量をELISAで測定した。SDF-1 α 、MIP-1 β は市販品を用いた。

(倫理面への配慮)

該当事項無し。

C. 研究結果

(1)調整した精製細胞膜画分と精製HIVビリオンの反応で混合液上清中に遊離されるp24量は4°Cでのプレインキュベーション後の温度シフトが、4~25°Cでは有意に上昇せず、37~40°Cで顕著に上昇した。

(2)非特異的endocytosisで細胞内に侵入する事が知られている偽VSV/NL43ビリオンを、同等の感染価を示すNL43ビリオンと比較したところ、p24遊離反応はNL43ビリオンでのみ観察され、VSV/NL43ビリオンではバックグラウンドレベルであった。

(3)CXCR4陽性HeLa細胞、CD4発現HeLa-CD4(MAGI)細胞、さらにCCR5を発現させ

たHeLa-CD4-CCR5(MAGIC5)細胞の各膜面分と、NL43及びJRFLビリオンの反応は、HIV感染のリセプター拘束性と完全に一致した。HeLa細胞膜は何れのビリオンに対してもp24の遊離を惹起せず、MAGI細胞膜はJRFLからのp24遊離を誘導しなかった。(4)X4 HIV侵入の強力なブロッカーであるSDF-1 α で処理された膜面分は、NL43ビリオンに対するp24遊離誘導効果が強く阻害され(80~90%)、R5 HIVの弱いブロッカーであるMIP-1 β 処理膜面分では、JRFLのp24遊離阻害は20%と弱かった。(5)細胞膜とビリオンとのインキュベーションで観察されるp24遊離反応のkineticsは、各種HIV侵入アッセイで報告されている所要時間(2時間)より著しく遅く、有意の反応までに4時間以上を要し、プラトーに達するのは16~24時間後であった。

D. 考察

HIV感染は吸着・膜融合・脱殻と進行するが、細胞培養系では侵入過程をトータルで測定できても、各素過程を定量的に検討できない。本研究では、これまで取り組んできた無細胞系がHIV侵入素過程をどこまで再現できているか検討を加えた。

細胞膜とビリオンを4 $^{\circ}$ Cで混合後のp24遊離反応進行には、37 $^{\circ}$ Cへの温度シフトを要することから、吸着反応は細胞培養系と同様に、4 $^{\circ}$ Cの条件で観察し得る事が示唆された。一方、VSV-G偽ビリオン、Env欠損ビリオンではp24の遊離が観察されず、且つ、HeLa細胞膜にはビリオン融合活性がなく、MAGI細胞膜はX4 HIVのみに活性を示すことから、本無細胞系はリセプターを介した特異的融合反応を検出し、非特異的なendocytosis経路を排除しているものと考えられた。従って、本反応系では特異的侵入阻止剤であるSDF-1 α やMIP-1 β の阻害効果の強弱を培養系での報告と極めて一致した値で検知できたものと思われる。

他方、本無細胞系と培養細胞侵入系との大きな差異として、反応速度の違いが観察された。細胞培養系では2時間での

融合完了が知られている。本無細胞系ではp24遊離の飽和到達に16~24時間を要した。仮に、細胞膜-ビリオン融合は短時間で完了し、次の脱殻過程が律速段階としたら、subcellular分画で本無細胞系を再構成する事により、nucoating factor?を見出せる可能性を秘めているよう。

E. 結論

本研究で樹立を試みているHIV侵入の無細胞系が、HIV吸着・融合・脱殻の各侵入素過程をどこまで再現できているか検討を加えた。その結果、①endocytosisによる非特異的侵入ではなく、②Envとreceptorの結合を介す特異的侵入を、③X4 HIV/R5 HIV特異的に検出でき、④侵入阻止剤SDF-1 α 、MIP-1 β の阻害効果の強弱を識別できる、ことを示した。

F. 健康危険情報

該当事項無し。

G. 研究発表

I. 論文発表

- 1) Kojima, A., Yasuda, A., Asanuma, H., Ishikawa, T., Takamizawa, A., Yasui, K. and Kurata, T.: Stable high-producer cell clone expressing virus-like particles of the Japanese encephalitis virus E protein for a second-generation subunit vaccine. *J. Virol.* 77: 8745-8755, 2003.
- 2) 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) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項無し。

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

6. Env/Gag 蛋白の相互作用と HIV-1 の細胞侵入との関連

協力研究者 村上 努 琉球大学大学院医学研究科免疫学分野助教授

共同研究者 Eric O. Freed (NCI-Frederick, USA)

研究要旨： 標的細胞への吸着・侵入段階における HIV-1Gag 蛋白のプロセッシング、Env 蛋白 gp41 細胞質内ドメイン (gp41CT) の役割の解明のため、HIV-1 プロテアーゼ欠損変異株、gp41CT 変異株を用いて標的細胞との融合過程への影響を検討した。昨年度は、1) HIV-1 と標的細胞との融合過程に Gag 蛋白のプロセッシングが必要なこと、2) Gag 蛋白前駆体との相互作用ができなくなった gp41CT 変異株では、Gag 蛋白のプロセッシングなしでもウイルスと細胞との膜融合が起こることを明らかにした。今年度は、Gag 蛋白のプロセッシングによって制御されている過程を検討し、少なくともウイルスと標的細胞との結合や、レセプターの結合によって活性化され形成される膜融合中間体である 6-ヘリックスバンドルの形成は Gag 蛋白のプロセッシングによって影響を受けないことを明らかにした。

A. 研究目的

我々は、HIV-1Gag 蛋白のプロセッシングとウイルスと細胞との膜融合の関係について以下のような作業仮説を考えた。すなわち、プロテアーゼが作用する前の未成熟 HIV-1 粒子中では gp41 と Pr55^{Gag} の相互作用によって Env 蛋白が膜融合不活性な状態に抑制されており、ウイルスが成熟前に不都合な膜融合を起こすことを防止している。次に Gag 蛋白のプロセッシングによる MA のコンフォメーション変化が引き金になって gp41 と Gag 蛋白の相互作用が弱まり、同時に Env 蛋白のコンフォメーションが膜融合活性型に変換され、新たな感染の準備が整うとい

うものである。そして、この仮説を HIV-1 プロテアーゼ欠損変異株、Pr55^{Gag} との相互作用ができない gp41CT 変異株を用いて標的細胞との融合過程への影響を検討することにより検証した。今年度は、Gag 蛋白のプロセッシングによって制御されている過程がウイルスの侵入過程のどこにあるのかを検討した。

B. 研究方法

(1) ウイルス結合試験：293T 細胞に Env 欠損 HIV-1 プロウイルス DNA (プロテアーゼ無傷または欠損株の両方) と Env 発現プラスミド (野性株と gp41CT 変異株) をコト

ランスフェクトして得られたシュード HIV-1 粒子を遠心濃縮（10倍）した。標的細胞である Molt-4 #8 細胞に 抗 CD4 モノクローナル抗体 (Beckman, 13B8.2) またはコントロール IgG1 存在下でこの濃縮ウイルス粒子を添加して 37°C で 30 分インキュベートした。次に、抗 gp120 ラットモノクローナル抗体 (W#10)、PE-標識二次抗体で細胞を染色し、結合したウイルス量をフローサイトメーターにて定量した。

(2) 6-ヘリックスバンドル (6HB) 形成試験: HIV-1 プロウイルス DNA (野性株と gp41CT 変異株それぞれについてプロテアーゼ無傷または欠損株) を用いて (1) と同様に濃縮ウイルスを調製した。このウイルスを 10 µg/ml の sCD4 存在・非存在下で抗 6HB 血清 (#948, FDA, R. Weiss 博士より分与) またはコントロール血清を添加して 37°C で 2 時間インキュベートした。遠心 (20,000 x g, 2 時間) にてウイルス回収し、破碎した。ウイルス破碎液 Protein G セファロースビーズにて免疫沈降し、沈降物を抗 gp41 モノクローナル抗体 (T32) (NIH, P. Earl 博士分与) によるウエスタン法により解析した。

(倫理面での配慮)

該当事項なし。

C. 研究結果

(1) ウイルス結合試験

野性株 NL4-3 と gp41CT 変異株 CTdel-144 ともプロテアーゼ無傷または欠損株の CD4 に依存したウイルス結合にほとんど差が認め

られなかった (図 1)。

(2) 6HB 形成試験

野性株 NL4-3 では、sCD4 無添加では、プロテアーゼ無傷、欠損株とも 6HB 形成はごくわずかだが、sCD4 の添加によってその形成は約 2.5 倍と顕著に増加した。一方、gp41CT 変異株 CTdel-144 では、sCD4 無添加においてもプロテアーゼ無傷、欠損株ともはっきりとした 6HB 形成を示し、sCD4 の添加によってもその形成量はほとんど変化しなかった。いずれにしても、プロテアーゼ無傷と欠損株の間に 6HB 形成についてほとんど差は認められなかった (図 2)。

D. 考察

HIV-1 プロテアーゼの活性化、言い換えると Gag 蛋白のプロセッシングによって制御されている過程を検討した結果、少なくともウイルスと標的細胞との結合や、レセプターの結合によって活性化され形成される膜融合中間体である 6-ヘリックスバンドル (6HB) の形成は Gag 蛋白のプロセッシングによって影響を受けないことを明らかにした。おそらく、6HB 形成後のヘミフュージョンか膜融合孔形成・拡大が制御されていると予想される。今回の研究成果は、HIV-1 がその感染性を獲得する成熟という増殖過程に Env 蛋白の膜融合の活性化をリンクさせていることを示すと同時に、現在エイズの治療に臨床で使用されている薬剤の一つであるプロテアーゼ阻害剤の作用機序の一つを明確にしたことである。先に述べた HIV-1 プロテアーゼの活性化によっ

て制御されている過程が特定できれば、それは新たな作用機序を有する HIV-1 侵入阻害剤の標的となりうると考えられる。

E. 結論

HIV-1 と標的細胞との膜融合過程はウイルスのプロテアーゼの活性化 (Gag 蛋白のプロセッシング) によって制御されている。制御を受けている過程はウイルスと標的細胞との結合や、レセプターの結合によって活性化され形成される膜融合中間体である 6-ヘリックスバンドル (6HB) の形成ではなかった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshida, A., R. Tanaka, T. Murakami, Y. Takahashi, Y. Koyanagi, M. Nakamura, M. Ito, N. Yamamoto, and Y. Tanaka. 2003. Induction of productive 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.
2. Tang, S., T. Murakami, B. N. Cheng, A. C. Steven, E. O. Freed, and J. G. Levin. 2003. Human immunodeficiency virus type

1 N-terminal capsid mutants containing core with abnormally high levels of capsid protein and virtually no reverse transcriptase. *J. Virol.* 77:12592-12602.

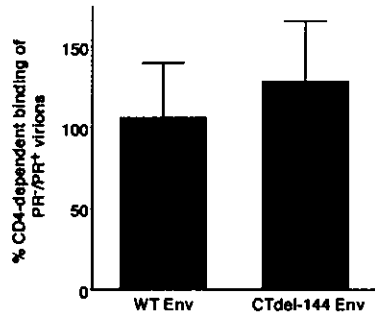
3. Murakami, T., S. Ablan, E. O. Freed, and Y. Tanaka. 2004. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. *J. Virol.* In press.

2. 学会発表

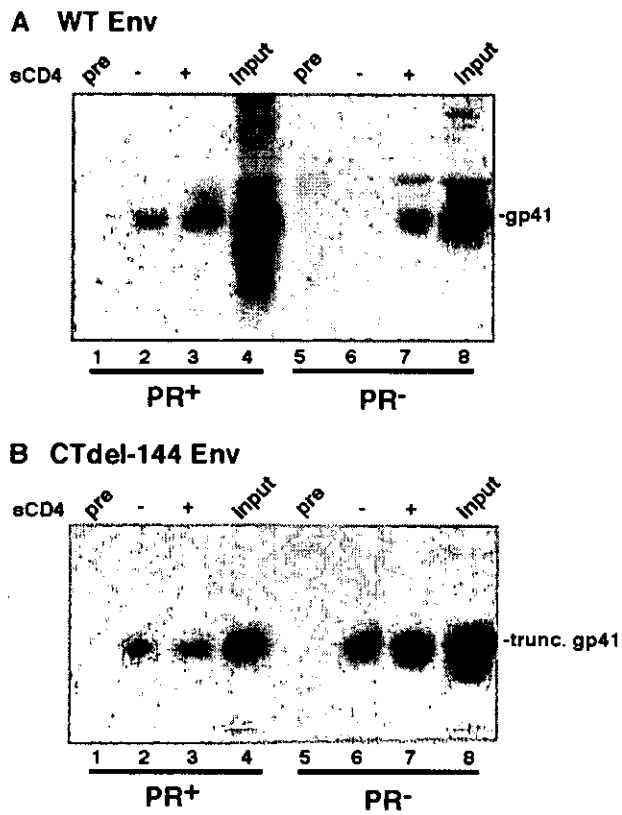
1. Murakami, T., S. Ablan, Y. Tanaka, and E. O. Freed. Relationship between Env-Gag interactions virus-cell fusion. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor, N.Y., USA. 20-25 May, 2003.
2. 村上 努, 田中勇悦 HIV-1Gag 蛋白による Env 蛋白膜融合活性の制御 第51回日本ウイルス学会学術集会、平成15年10月27-29日 (京都)
3. 村上 努, 広瀬国孝、谷中幹郎、山本直樹、田中勇悦 新規ケモカインレセプター阻害剤 T-1113 を用いた R5/X4 HIV-1 感染 PBMC 刺激培養による CD4 陽性 T 細胞の大量培養 第17回日本エイズ学会集会・総会 平成15年11月27日-29日 (神戸)
4. 村上 努, S. Ablan, E. O. Freed, 田中勇悦 HIV-1Gag タンパクによるウイルスと標的細胞との膜融合の制御 第26回日本分子生物学会年会、平成15年12月10-13日 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし



⊠ 1. PR⁺ and PR⁻ HIV-1virions display comparable levels of CD4-dependent binding to target cells



⊠ 2. PR⁺ and PR⁻ HIV-1virions display comparable levels of 6HB formation

7. ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 生活環におけるアクチンの役割に関する研究

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)

研究要旨

actin-related protein 2/3 complex (Arp2/3 複合体) は細胞の形態変化に伴うアクチン細胞骨格の再構成を制御し、細胞膜直下に存在する密なアクチン網 (cortical actin) の一部を構成している。我々は Arp2/3 複合体の機能を負に制御すると、HIV-1 感染の効率が低下することを見出した。これは、レトロウイルスの中でも霊長類レンチウイルス (SIV と HIV-1) により特異的であることが示された。HIV-1 の感染を VSV-G pseudotyping によって強制的に endocytosis に変化させると、Arp2/3 複合体機能抑制は HIV-1 の感染効率に影響しない。アクチン重合阻害剤を用いたこれまでの研究と以上の知見を照らし合わせると、レンチウイルス感染には、ウイルス-細胞膜融合と逆転写反応までの間に、Arp2/3 複合体に依存性のアクチン重合を伴う複製過程が存在することが考えられる。

A. 研究目的

近年、ウイルス増殖における宿主因子の寄与が注目されている。HIV-1 複製の初期・後期過程においては、ウイルスと宿主因子間に複雑かつ特異的な相互作用が起きる。しかし、その分子基盤の大部分が未解明である。我々の研究は、ウイルス遺伝子産物と宿主因子との相互作用を、細胞中に最も多く存在する構造タンパク質、アクチンの機能制御に注目することで明らかにすることを目的とする。世界的に蔓延するエイズに対し、実用に足る有効なワクチンの開発は未だ報告されておらず、化学療法は薬剤耐性ウイルスの発生という難題に直面している。したがってエイズの完全抑止には新

たな治療標的の検索が必須である。当研究は、ウイルスに由来する酵素活性を阻害することに重点を置く従来の薬剤とは異なり、新規な作用機序をもつ先駆的な HIV-1 増殖阻害薬の開発の可能性に繋がるものでもある。

昨年度までに、我々はアクチンの新生鎖合成に重要な役割を持つ Arp2/3 複合体が、HIV-1 の増殖を制御する新たな宿主因子であることを同定した。本年度はその作用機序を分子レベルで解明することを主たる目的として以下の研究を進めた。

B. 研究方法

Arp2/3 複合体の活性化を負に制御するため、Wiscott-Aldrich syndrome protein (WASP) の C 末端に存在する VCA 領域や cortactin の N 末端に存在する NTA 領域を、GFP の C 末端に結合させた融合タンパク質をヒト細胞に発現する系を確立した。同時に Arp2 を標的とする siRNA を用いて Arp2/3 複合体の発現量を低下させることに成功した。HEK293 細胞あるいは H9 細胞に、Arp2/3 複合体の機能を負に制御する上記因子を導入した。これらにウイルスを感染させ、感染効率をウイルスにコードされるレポーター遺伝子の発現量にて計測した。Arp2/3 複合体制御因子の発現ベクターと co-transfection されたウイルスレセプターによって、ウイルスは遺伝子導入された細胞に選択的に感染する。遺伝子導入の効率を測定するため、ウイルスのもつレポーターとは異なるレポーター遺伝子を発現するベクターも同時に標的細胞に導入した。遺伝子導入後 2 日目に細胞の一部を回収して遺伝子導入効率を測定した。一方、残りの細胞にウイルスを感染させた。感染後に、標的細胞におけるウイルスのレポーター遺伝子活性を計測した。この値を遺伝子導入効率にて標準化し、GFP あるいは GFP を標的とする siRNA を導入した場合を 100% とし、Arp2/3 複合体制御因子導入細胞へのウイルス感染効率を求めた。使用したウイルスを表 1 に示した (表 1)。

C. 研究結果

Arp2/3 複合体の機能を複数の異なる方法に

より抑制すると、HIV-1 の感染効率が低下することが判明した。つまり、Arp2/3 複合体がウイルス増殖に関わる新たな宿主因子であることを示している。HIV-1 が細胞内へ侵入する経路を VSV-G を介した行程に強制的に変化させると、Arp2/3 複合体の機能を抑制しても HIV-1 の感染効率は低下しなかったことから、ウイルスと細胞の膜が融合した直後に Arp2/3 複合体依存性の複製過程が存在することを示唆している。感染効率の低下に寄与しているウイルス遺伝子は、少なくとも nef、env、vpu ではないことを同定した。さらに、上皮細胞を用いた実験だけではなく、HIV-1 の自然宿主である T 細胞を標的に用いた実験でも同様の結果が得られた。Arp2/3 複合体の機能を抑制すると、SIV 増殖効率が抑制された。しかし、MLV の感染は抑制されなかったことから、Arp2/3 複合体の機能が感染により重要な役割を持つのは、レトロウイルスの中でも、レンチウイルスに特徴的な性質であることが推測された。一方、阻害剤を用いた研究で感染にアクチンが必要であろうと考えられているアデノウイルスと単純ヘルペスウイルスでは、Arp2/3 複合体の機能を抑制しても感染効率は低下しないことが観察された。以上の結果を簡潔に表にまとめた (表 1)。

D. 考察

HIV-1 は膜融合の後、細胞質を横切り、細胞の核に短時間で接近するためには、微少管輸送系を利用している可能性が示されている。しかし、微少管は細胞膜直下に直接結合していないことから、ウイルスが微少管にアクセスするために何らかの輸送系が存在することが示唆されていた。レンチウイルスが効率良く細胞に感染するためには、Arp2/3 複合体を活性化し、アクチン新生鎖合成によって生じる推進力を利用して、受動的に通過する事が困難と思われている cortical actin layer を通過し、微少管にアクセスする可能性が考えられる (図1)。Arp2/3 複合体の抑制が、複数のウイルス種の中でもレンチウイルスに最も強く影響したことは、HIV-1 の増殖を特異的に阻害する薬剤開発に弾みをつける知見である。

E. 結論

霊長類レンチウイルスが効率良く細胞に感染を成立させるためには、膜融合から逆転写反応までの過程に、Arp2/3 複合体依存性のアクチン重合が重要な役割を果たしていることが考えられた。

F. 研究発表

(1) 論文発表

Kennedy G, Komano J, Sugden B. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Nov 5

(2) 学会発表

Kousuke Miyauchi, Jun Komano, Yoshiyuki Yokomaku, and Zene Matsuda: The role of the membrane spanning domain of HIV-1's TM in the membrane fusion, Cold Spring Harbour Meeting on Retroviruses, CSH, NY, USA, May 2003

Jun Komano: Cytoskeletal Support of Viral Life Cycle, Jpn Retrovirus Mtg 2003 Summer Seminar, Sugadaira, Nagano, June 2003

Jun Komano: New Host Factor Involved in the Early Phase of HIV-1's Life Cycle, Hakuba Symposium on HIV, Hakuba, Nagano, Aug 2003

Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda, Naoki Yamamoto: Role of Arp2/3 in the early phase of HIV-1's life cycle, 51st Ann Mtg of the Jpn Soc for Virol, Kyoto, Jpn, Oct 2003

Saki Shimizu, Yoshiyuki Yoshinaka, Ryuichiro Kimura, Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Zene Matsuda, Naoki Yamamoto: HIV-1 慢性感染細胞におけるプロテオーム解析, 51st Ann Mtg of the Jpn Soc for Virol, Kyoto, Jpn, Oct 2003

Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Zene Matsuda: 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,
51st Ann Mtg of the Jpn Soc for Virol,
Kyoto, Jpn, Oct 2003

Wataru Sugiura, Lay Myint, Jun Komano,
Masakazu Matsuda, Zene Matsuda, Masako
Nishizawa: 薬剤耐性 HIV-1 における粒子
形成過程の形態学的解析, 51st Ann Mtg of
the Jpn Soc for Virol, Kyoto, Jpn, Oct
2003

Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda,
Naoki Yamamoto: ウイルス感染初期過程に
おける Arp2/3 複合体の重要性, 26th Ann Mtg
for Jpn Soc Mol Biol, Kobe, Jpn, Dec 2003

Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Zene
Matsuda: HIV-1 エンベロープタンパク質
膜貫通領域 (membrane spanning domain,
MSD) の膜融合後期過程への寄与, 26th Ann
Mtg for Jpn Soc Mol Biol, Kobe, Jpn, Dec
2003

G. 知的所有権の取得状況

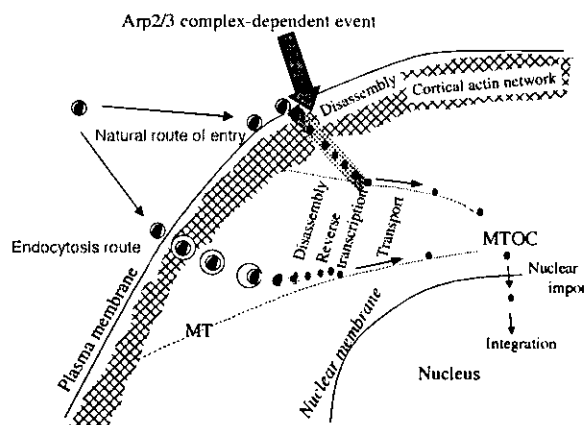
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 当研究で検討したウイルスとその感
染モードおよび GFP-VCA 発現による感染効

率への影響

Virus	Mode of viral entry	Effect of GFP-VCA on viral entry
vaccinia virus	macropinocytosis	inhibited
HIV-1	membrane fusion at cell surface	inhibited
ecolHIV-1	s/o membrane fusion at cell surface	inhibited
ecolHIV-1	endocytosis	Not inhibited
SIV	membrane fusion at cell surface	inhibited
ecoMLV	s/o membrane fusion at cell surface	Not inhibited
ecolMLV	endocytosis	Not inhibited
HSV-1	membrane fusion at cell surface	Not inhibited
Adenovirus	clathrin-dependent endocytosis	Not inhibited

図1 レンチウイルス感染初期過程には、
Arp2/3 複合体依存性のプロセスが存在する



8. Methyl- β -cyclodextrin による CD4-independent HIV-1 感染の阻害

研究協力者： 久保 嘉直 長崎大学 熱帯医学研究所 エイズ感染防御分野

研究要旨：細胞膜にはコレステロール及び糖脂質に富んだラフトと呼ばれる領域が存在し、シグナル伝達の足場として機能していることが知られている。HIV-1 感染においても、CD4 がラフトに局在していることから、ラフトの構成成分の1つであるコレステロールを抽出する methyl- β -cyclodextrin (M β CD) 処理によって阻害されることが報告された。しかし、HIV-1 感染の co-receptor である CXCR4 は非ラフト領域に存在する。そこで、HIV-1 感染においてラフトが普遍的に必要なかどうかを知るため、直接 CXCR4 に結合し感染する CD4-independent HIV-1 感染における M β CD の影響を解析した。その結果、CD4-independent HIV-1 感染も M β CD によって阻害されることがわかった。CXCR4 および糖脂質 GM3 の発現には影響しなかった。これらの結果は、CD4-independent HIV-1 感染においても、ラフトの構成成分の1つであるコレステロールが重要な働きをしていることを示している。

A. 研究目的

細胞膜は、様々な脂質が均一に存在しているのではなく、ラフトと呼ばれるコレステロールおよび糖脂質に富んだ領域が細胞膜上に「いかだ」のように存在することがわかっている。このラフト領域には、様々な細胞因子の受容体や細胞接着因子が局在しており、シグナル伝達の足場として機能していることが知られるようになった。リンパ球細胞においては、免疫に関与する CD4、T 細胞受容体、MHC がラフトに局在しており、免疫シナプスと呼ばれている。

HIV-1 感染においても、細胞膜からコレステロールを抽出しラフトを破壊する methyl- β -cyclodextrin (M β CD) が阻害的な効果を示し、ラフトが重要であると報告されている。また、HIV-1 の receptor である CD4 がラフトに局在していること、ラフトに局在できない CD4 変異体は HIV-1 の receptor として機能しないことが報告されている。しかし、HIV-1 の co-receptor である CXCR4 は非ラフト領域に存在することが示されている。そこで、HIV-1 感染においてラフトが普遍的に重要かどうかを知るため、非ラフト領域に局在する CXCR4 に直接結合し感染する CD4-independent HIV-1 における M β CD の影響を解析した。

B. 研究方法

HIV-1 NDK 株より派生した CD4-independent HIV-1 mNDK の envelope 蛋白質 (Env) 発現プラスミドは、フランス Dr. Hazan より分与された。LacZ 遺伝子を持つ HIV-1 vector は、アメリカ AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH を通し Dr. Chang より分与された。

HIV-1 gag, pol, rev, tat を発現する packaging プラスミドは、スイス Dr. Trono より分与された。これらのプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションすることによって CD4-independent HIV-1 vector particle を調製した。この vector を M β CD 処理または未処理 293T 細胞、TE671 細胞、NP2 細胞、HeLa 細胞および NP2 細胞に CXCR4 を導入した NP2/X4 細胞 (群馬大学、星野先生より分与) に感染させ、X-Gal 染色により感染価を測定した。

CD4, CXCR4 の細胞表面発現は、それぞれの抗体 (琉球大学、田中先生より分与) を用いた FACS により評価した。また細胞表面における糖脂質 GM3 の発現は、Alexa Flour 555-conjugated コレラ毒素 β サブユニットを用いた FACS によって測定した。

蛋白質のラフト局在は、細胞を 0.1 % Triton X-100 に溶かし、可溶性画分と不溶性画分をウエスタンブロットティングすることによって評価した。ラフト蛋白質は、不溶性画分に存在する。ラフト蛋白質のコントロールとしてカベオリンを用いた。

C. 研究結果

1. CD4-independent HIV-1 の細胞特異的感染：本研究において使用された CD4-independent HIV-1 mNDK が、CD4 を発現していない細胞に感染することを確認するため、NP2 細胞、NP2/X4 細胞および NP2/CD4/X4 細胞に感染させ、タイターを測定した。その結果、NP2/X4 細胞において約 5×10^2 pfu/ml、NP2/CD4/X4 細胞において 1×10^4 pfu/ml のタイターが検出された。この結果は、mNDK HIV-1 が CD4-independent