

infection を示すが、CD4 の存在下においては、CD4-dependent infection を示すことを表している。また、293T 細胞において 5×10^2 pfu/ml、TE671 細胞において 2×10^2 pfu/ml のタイターが検出されが、HeLa 細胞においては、 2×10^1 pfu/ml のタイターしか検出されなかった。HeLa 細胞および TE671 細胞においては高レベルの CXCR4 発現が、293T 細胞においては低レベルの CXCR4 発現が観察された。この結果は、CXCR4 を高レベル発現しているにもかかわらず HeLa 細胞は CD4-independent HIV-1 感染に対する感受性が低いことを示している。

2. M β CD による CD4-independent HIV-1 感染の阻害: NP2/CD4/X4 細胞における HIV-1 NDK 感染および HIV-1 mNDK 感染は M β CD によって影響を受けなかった。一方、NP2/X4 細胞 (Fig. 1)、TE671 細胞、293T 細胞における mNDK (CD4-independent) HIV-1 感染は、M β CD によって阻害された。この阻害効果は、コレステロールの添加によって回復した。この結果は、CD4-independent HIV-1 感染においてラフトの構成成分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。M β CD による CD4、CXCR4 の細胞表面発現における影響を FACS により解析したが、処理細胞も未処理細胞と同程度の CD4、CXCR4 を発現していた。

3. CXCR4 の局在: NP2 細胞において CXCR4 が非ラフト領域に存在することを確認するため、C 末端に HA エピトープを結合させた CXCR4 を NP2 細胞に導入し、0.1 % Triton X-100 によって可溶性画分と不溶性画分に分け、それぞれを抗 HA 抗体によりウエスタンブロッティングを行なった。その結果、HA-tagged CXCR4 は、可溶性画分に存在することがわかった。カベオリン蛋白質は、可溶性画分と不溶性画分の両方において検出された。この結果は、CXCR4 が非ラフト領域に存在していることを示している。

4. 糖脂質 GM3 の関与: コレステロール以外のラフトの重要な構成成分である糖脂質が、HIV-1 Env に結合し感染を助けることが報告されている。M β CD による CD4-independent HIV-1 感染の阻害が、コレステロールとともに糖脂質も抽出することによって起こるのかどうかを知るため、以下の実験を行なった。糖脂質の1つである glycosphingolipid GM3 の発現をコレラ毒素 β サブユニットにより解析した。その結果、293T 細胞、TE671 細胞において GM3 の発現が検出されたが、NP2 細胞、HeLa 細胞においては検出されなかった。GM3 の発現と CD4-independent HIV-1 に対する感受性は相関していた。しかし、

M β CD 処理は glycosphingolipid GM3 の量に影響を与えなかった。この結果は、M β CD による CD4-independent HIV-1 感染の阻害が、GM3 の低下によって生じたのではないことを示している。

D. 考察

これらの結果は、M β CD が、glycosphingolipid GM3 ではなくコレステロールの低下によって CD4-independent HIV-1 感染を阻害することを示している。しかし、NP2/CD4/X4 細胞における CD4-dependent HIV-1 感染は、M β CD によって阻害されなかった。既に報告されているように、感染受容体を強発現した細胞においては、ラフトが存在しなくても受容体の集合が容易に起こるためであると思われる。CXCR4 を強発現する細胞において CD4-independent HIV-1 感染が M β CD によって阻害された理由は、CD4-independent HIV-1 と CXCR4 の親和性が低いためと考えられる。

一方、糖脂質が HIV-1 感染を活性化することが報告されており、私達の研究においても GM3 の発現と CD4-independent HIV-1 に対する感受性は相関していた。この結果は、GM3 が CD4-independent HIV-1 感染を活性化することを示唆している。NP2 細胞においては GM3 の発現は検出されなかったが、それ以外の糖脂質が発現している可能性も考えられる。GM3 発現が見られる 293T 細胞および TE671 細胞においても M β CD によって CD4-independent HIV-1 感染は阻害された。しかし、GM3 発現は M β CD によって影響を受けなかった。糖脂質ではなくコレステロールがラフト構造の形成と維持に重要であることが示されており、たとえラフトの構成成分である糖脂質が存在していても、M β CD 処理細胞におけるラフト形成は低下していると考えられる。これらの結果は、CD4-independent HIV-1 感染においてもラフトが重要な働きをしていることを示している。CD4-independent HIV-1 Env が CXCR4 に結合した後ラフトに移行するのか、ラフトに存在する CXCR4 のみを認識するのかは、いまだ不明である。

E. 結論

これらの結果は、CD4-independent HIV-1 感染においてもラフト構成成分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。この結果は、ラフト構造の形成や維持に関わるコレステロールや糖脂質の生合成および代謝に影響する物質が、HIV-1 感染症に対する新たな

治療法を提案することを示唆している。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Kubo, A. Ishimoto, and H. Amanuma. 2003. N-linked glycosylation is required for XC cell-specific syncytium formation by the R peptide-containing envelope protein of ecotropic murine leukemia viruses. *J.Virol.* 77:7510-7516.
- (2) Y. Kubo, and H. Amanuma. 2003. Mutational analysis of the R peptide cleavage site of Moloney murine leukemia virus envelope protein. *J.Gen.Virol.* 84:2253-2257.
- (3) Y. Kubo, A. Ishimoto, and H. Amanuma. 2003. Genistein, a protein tyrosine kinase inhibitor, suppresses the fusogenicity of Moloney murine leukemia virus envelope protein in XC cells. *Arch.Virol.* 148:1899-1914.
- (4) M. Katane, R. Fujita, E. Takao, Y. Kubo, Y. Aoki, and H. Amanuma. An essential role for the His-8 residue of the SDF-1 α -chimeric, tropism-redirecated Env protein of the Moloney murine leukemia virus in regulating postbinding fusion events. *J.Gene Med.* In press.

2. 学会発表

- (1) 久保嘉直、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹：CD4-independent HIV-1 感染に対する cyclodextrin の阻害効果. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003 年、京都.
- (2) 久保嘉直、天沼宏：マウス白血病ウイルス感染におけるエンベロープ蛋白質 R ペプチド切断の重要性. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003 年、京都.
- (3) 天沼宏、片根真澄、久保嘉直：マウスレトロウイルスエンベロープ蛋白質の受容体特異性の改変. 第 51 回日本ウイルス学会学術集会、2003 年、京都.

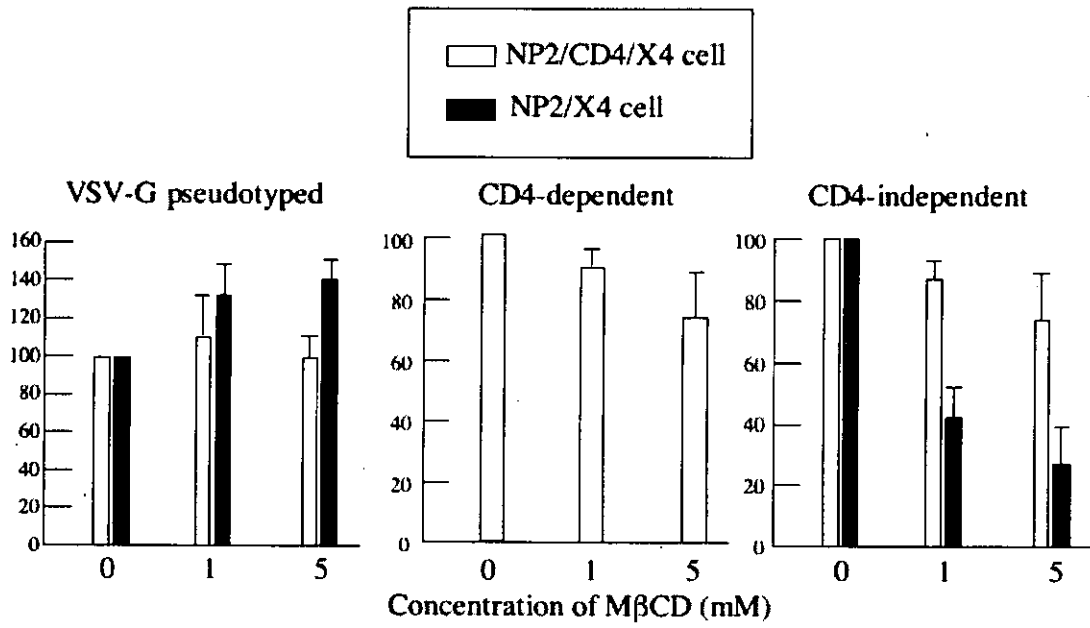


Fig. 1 VSV-G pseudotyped、CD4-dependent、CD4-independent HIV-1vector 感染における MβCD の影響

9. HIV-1Vpr と相互作用する細胞内因子の解析

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)

研究要旨: Vpr は HIV 粒子に取り込まれるアクセサリ-遺伝子産物であり、HIV-1 Pre-integration complex (PIC) のマクロファージにおける核移行に重要である。これまで我々は、Vpr が importin α を介して核移行することを明らかにしてきた。本研究では、Vpr の核移行が複数ある importin α の isoform の内、主要な 3 つの isoform (Rch1, Qip1, NPI-1) により促進される事を明らかにした。いずれの isoform もヒト末梢血単球および静止期 CD4⁺T 細胞より、最終分化マクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞において高い発現が認められた。これらの細胞質画分を用いて核移行解析を行った結果、末梢血単球および静止期 CD4⁺T 細胞では、Vpr は核膜に局在したままであったが、最終分化マクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞で核移行を示したことから、この核移行の促進効果は、Rch1 の発現量と比例している可能性が示唆された。一方、importin α との結合能を失った Vpr 変異体は核移行を示さなかった。さらに、最終分化マクロファージに Vpr をマイクロインジェクションすると核移行を示したが、変異体では消失した。同様に、この Vpr 変異体を有する HIV-1 のマクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞への感染性が減弱した。以上の結果から、生体内の HIV-1 標的細胞における HIV-1 感染において、Vpr の核移行能の重要性が示された。

A. 研究目的

HIV-1 アクセサリ-遺伝子の一つである Vpr 産物は AIDS 患者の血清中に大量に存在し、ウイルス感染効率の上昇および HIV 潜伏感染細胞からのウイルス産生を惹起するなど、AIDS 発症の key factor として注目されている。また、リンパ球系細胞を G2 期で arrest すること、細胞の分化、多倍体化、アポトーシスを誘導することも明らかになった。興味深いことに最近、Vpr 蛋白が HIV 感染細胞を G2 期で arrest させる結果として、ウイルスの複製効率を著しく高めること、さらに可溶化 Vpr 蛋白を HIV 非感染細胞に添加すると、アポトーシスが誘導されることが証明された。従って、Vpr 蛋白の多様な機能の発現機序の解明がエイズ発症機構を明らかにするためには必須であるといえる。また、Vpr 蛋白は preintegration complex (PIC) を形成することにより、マクロファージなどの非分裂細胞においてウイルス核酸の核移行を促すことが明らかになっている。

Vpr 蛋白は、 α -helix、ロイシンジッパー様、アルギニンに富むドメインから構成されており、相互作用する細胞内因子の報告もある。まさに、Vpr 蛋白の機能はその 3 次元構造と結合する細胞内因子によって制御されているといえる。従って、Vpr 結合性細胞内因子を同定することこそ、HIV-1 複製と AIDS 発症の制御機構の解明のために必須である。そこで、本研究では、我々が以前に同定した Vpr 結合性細胞内因子 Importin α を介して制御される Vpr の核移行の発現機構の解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

1) 蛋白質の精製: 組換え型 Importin α を N 末端側に GST を持つ融合蛋白として大菌に発現させ、protease にて GST を切断除去した。Vpr の各ドメイン及びそれらの点変異体を、N 末端側に GST、C 末端側に GFP を持つ融合蛋白として調製した。

- 2) *in vitro*核移行解析：Digitonin処理 HeLa細胞を用いて行った。
- 3) pull-down assay：GST融合 importin α isoformおよび野生型及び各種変異型VprとGFPとの融合蛋白を使用した。また、野生型及び各種変異型Vpr発現ベクターをHeLa細胞に導入し24時間培養後の細胞抽出液を用いた。
- 3) 細胞の調製：健康なドナー由来末梢血リンパ球からCD4⁺T細胞を分画後、OKT3とCD28で同時に刺激し、IN2含有培地で増殖させたものを活性化CD4⁺T細胞とした。MALS systemを用いて単球を分画し、マクロファージはAB serum とGM-/M-CSF含有培地で培養した。
- 4) 定量RT-PCR法：細胞から総RNAを回収後、Superscript preamplification systemによりcDNAを調整した。24ngの総DNAに対してimportin α isoform特異的なプライマーとSYBR GreenIを用いたインターカレーション法でRT-PCRを行った。
- 5) Western blot法：タンパク質発現を抗Rch1抗体を用いて検出した。
- 6) 核移行の蛍光イメージング法：GFP融合N17C74、あるいはN17C74変異体の精製タンパク質を最終分化マクロファージの細胞質にマイクロインジェクションした細胞は培養液中で生きたまま使用し、蛍光タンパク質の挙動を蛍光顕微鏡、高解像度CCDカメラを用いて経時的に15分間観察した。
- 7) 感染実験：NL432およびNF462のvprに変異を挿入し、COS-1細胞に導入してウイルスを産生させた。各々のウイルス量はp24値で揃えて、CD4⁺T細胞およびマクロファージに感染させた。感染後30日まで、ウイルス量を p24 ELISA法で測定した。

C. 研究結果

(1) Vpr の核移行に関与する importin α の isoform の解析

以前に我々は、Vpr 核膜に結合後、importin α の働きにより核内へと移行することを明らかにした。アダプター分子 importin α のみを介して核移行が促進される蛋白質は Vpr が初めてであることから、Vpr の核移行能に関与する importin α の isoform を検討した。importin α には複数の isoform が存在するが、それらは3つのサブファミリーを形成しており、それぞれ約 50%のアミノ酸相同性がある。まず、Vpr の核移行に必要なヒト isoform を *in vitro* 核移行解析によって同定した。3つの isoform、Rchl、Qipl 及び NPI-1 のいずれによっても核移行が促進された。その効果は Rchl が最も強かった。

次に、各々の isoform と Vpr との結合を pull-down assay によって解析した結果、何れの isoform も Vpr と直接結合した。以上の結果から、Vpr は3つの isoform、Rchl、Qipl 及び NPI-1 との結合を介して核移行することが示唆された。

(2) HIV-1 標的細胞における importin α isoform の発現

これらの isoform がヒト末梢血単球、最終分化マクロファージ、静止期および活性化 CD4⁺T 細胞に発現しているか否かを定量 RT-PCR 法により解析した。最終分化マクロファージと活性化 CD4⁺T 細胞は末梢血単球および静止期 CD4⁺T 細胞と比較して全ての発現が高かった。さらに、Rchl のタンパク質発現は mRNA 発現と同様に最終分化マクロファージと活性化 CD4⁺T 細胞で多く発現していた。

以上のことから、Vpr の核移行は実際にマクロファージおよび CD4⁺T 細胞において、Rchl、Qipl、NPI-1 により優位に促進される可能性が考えられた。

(3) HIV-1 標的細胞における Vpr の核移行解析

次に、同一ドナー由来のヒト末梢血単球、最終分化マクロファージ、静止期

CD4⁺T 細胞、活性化 CD4⁺T 細胞からの細胞質画分を用いて、Vpr の核移行能を調べた。その結果、末梢血単球および静止期 CD4⁺T 細胞では、Vpr は核膜に局在したままであったが、最終分化マクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞において Vpr は核移行を示した。この核移行の促進効果は、Rch1 の発現量と比例していた。

また、最終分化マクロファージの細胞質画分に Vpr をマイクロインジェクションしたところ、核移行を示した。

(4) Vpr の核移行には Vpr と importin α との結合が必須である

Vpr には 3 つの α -helix ドメインが存在する。そこで、各々のドメインに点変異を挿入した Vpr 変異体を作製し、GST を持つ融合蛋白質として精製し、Rch1 を用いた *in vitro* 核移行解析を行った。その結果、N 端側に存在する helix に点変位を挿入した Vpr 変異体 (α LA) は Rch1 によって促進される核移行能を完全に消失していた。一方、中央に存在する helix に点変位を挿入した Vpr 変異体 (F) はその核移行能を保持していた。

次に、これらの Vpr 変異体と Rch1 との相互作用を確認するために pull-down assay を行った。Rch1 による核移行能を完全に消失していた α LA は Rch1 との結合も消失していたが、核移行能を保持していた F は結合能も保持していた。

さらに、最終分化マクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞由来の細胞質画分を用いて、*in vitro* 核移行解析を行った。変異体 α LA は Rch1 による核移行能だけでなく、これらの細胞質画分による核移行能も完全に消失していた。また、最終分化マクロファージの細胞質領域に変異体 α LA をマイクロインジェクションしたところ、核移行しなかった。一方、F はこれらの細胞質画分による核移行能も、マイクロインジェクションによる核移行能も保持していた。

以上の結果から、最終分化マクロファージや活性化 CD4⁺T 細胞における Vpr の核移行には Vpr と Rch1 との結合が必須であることが示唆された。

(5) 最終分化マクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞への感染実験

Rch1 による核移行能を完全に消失していた α LA およびは核移行能を保持していた F を CD4⁺T 細胞指向性感染性 DNA クローン NL432 あるいはマクロファージ指向性感染性 DNA クローン pNF462 の *vpr* 遺伝子に組み換え、COS7 細胞に導入して、ウイルスを産生させた。次に、最終分化マクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞に感染させ、ウイルス量の変化を測定した。野生型ウイルス及び変異体 F を有するウイルスを感染させた場合に、顕著なウイルス産生が確認されたが一方、Rch1 による核移行能を完全に消失していた α LA および Vpr 欠失ウイルスではウイルスの産生量が著しく減少していた。

D. 考察

我々はこれまで、HeLa 細胞を用いた生化学的な *in vitro* 解析で Vpr の核移行を解析してきたが、本研究では同一ドナー由来の HIV-1 標的細胞を用いて、Vpr が importin α や細胞特異的な因子を介して核移行を示すことを示した。このように Vpr が新規核移行機序を用いて HIV-1 PIC を核内へ輸送する可能性が考えられた。

E. 結論

HIV-1 標的細胞である最終分化マクロファージおよび活性化 CD4⁺T 細胞内において、Vpr が importin α との相互作用を通じて核移行することを示した。さらに、この Vpr におよぶ核移行が HIV-1 感染に重要であることを示した。

F. 研究危険情報 該当事項なし。

G. 研究発表

1) 論文発表

1. Tajima S., Takahashi, M., Takesima S., Konnai S., Watarai S., Yin S, Tanaka Y., Onuma M., K. Okada and Aida Y. A mutant form of the Tax pprotein of bovine leukemia virus (BLV) with enhanced transactivation activity, increases the expression and propagation of BLV invitro but not in vivo. *J. Virol.*, 77:1894-1903, 2003.
2. Tajima S., Tsukamoto M., and Aida Y. Latency of viral expression in vivo is not related to CpG methylation in the U3 region and part of the R region of the long terminal repeat of bovine leukemia virus. *J. Virol.*, 77: 4423-4430, 2003.
3. Konnai S., Takeshima S., Tajima S., Yin S. A., Okada K., Onuma M., and Aida Y. The influence of ovine MHC class II *DRB1* alleles on immune response in bovine leukemia virus infection. *Microbiol. Immunol.*, 47: 223-232, 2003.
4. Kamata M., Miyamoto M., Yoneda Y., and Aida Y. Importin α promotes through nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type-1 Vpr as independent manner of importin β ., submitted.
5. Azunma A. and Aida Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle arrest at the G1 phase and apoptosis via disruption of mitochondrial function in rodent cells., submitted.
6. Iijima S., Kasahara Y., Kimata Y., Isogai M, Miwa M., Yokota Y., and Aida Y. Phenotype of HIV-1 lacking Vpr-mediated nuclear import is unable to replicate in primary CD4⁺T cells. Submitted.

2) 学会発表

1. 橋爪智恵子, 倉光球, 我妻昭彦, 間陽子: “HIV-1 Vpr と Spliceosome-associated protein (SAP)145 との相互作用を介して発揮されるスプライシング反応の阻害”, 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10 月, (2003).
2. 笠原 (仁田原) 優子, 宗田光峰, 飯島

沙幸, 横田恭子, 間陽子: “最終分化マクロファージ細胞内 importin α による HIV-1 Vpr の核移行解析”, 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10 月, (2003).

3. 我妻昭彦, 間陽子: “Vpr が及ぼす HIV-1 mRNA 発現パターンへの影響”, 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10 月, (2003).
4. 倉光球, 橋爪智恵子, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: “HIV-1 Vpr による pre-mRNA のスプライシング反応阻害の in vivo および in vitro 解析”, 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10 月, (2003).
5. 飯島沙幸, 木全清典, 三輪正直, 横田恭子, 間陽子: “HIV-1 感染・複製における vpr 遺伝子の機能”, 第 51 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 京都, 10 月, (2003).
6. 倉光球, 橋爪智恵子, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: “HIV-1 Vpr による pre-mRNA スプライシング阻害反応の解析”, 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11 月, (2003).
7. 橋爪智恵子, 倉光球, 我妻昭彦, 間陽子: “スプライソソームとの相互作用を介して起こる HIV-1 Vpr のスプライシング阻害反応の解析”, 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11 月, (2003).
8. 我妻昭彦, 木全清典, 間陽子: “HIV-1 mRNA の量比に及ぼす Vpr の影響の解析”, 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11 月, (2003).
9. 笠原 (仁田原) 優子, 宗田光峰, 飯島沙幸, 横田恭子, 間陽子: “HIV-1 標的細胞において importin α により促進される Vpr 核移行の解析”, 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11 月, (2003).
10. 飯島沙幸, 木全清典, 横田恭子, 三輪正直, 間陽子: “ウイルス増殖における HIV-1 Vpr の機能解析”, 第 17 回日本エイズ学会学術集会・総会, 神戸, 11 月, (2003).

3) 特許の出願

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

10. HIV-1 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

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免疫治療学

研究要旨

我々はすでに HIV-1 インテグラーゼが強い核局在能を持つことを報告してきたが、その核局在シグナル (NLS) の同定には至っていない。そこで本研究では、HIV-1 ウイルスゲノム (cDNA) の核内輸送におけるインテグラーゼの機能的関与をウイルス cDNA との結合能を低下させた変異体を用いて検討した。HIV-1 インテグラーゼのウイルス cDNA 結合に関与すると考えられているアミノ酸残基 (PYNP : 142-145 位) および三つのリジン残基 (KKK : 156,157,160 位) にアミノ酸置換あるいは欠損変異を導入した新たな HIV-1 インテグラーゼの変異体を作製した。HIV-1 インテグラーゼ蛋白の生化学的解析より、ウイルス cDNA との結合能が著しく低下 (野生型インテグラーゼ比で 10%以下) する変異体 (Δ PYNP, N144Q, KKK>AAA) を得た。これらの変異体のウイルス学的性状解析から、ウイルス感染性を顕著 (親株比で 1%以下) に低下させる変異体 (Δ PYNP, N144Q, KKK>AAA) を得た。さらに、感染細胞の核分画中のウイルス cDNA の定量解析および HIV-1 特異的 PNA プローブをもちいた FISH 解析よりこれらの変異体のウイルス cDNA の核内移行過程が阻害されていることを確認した。以上の結果はインテグラーゼがウイルスゲノムの核内移行過程に関与する主要ウイルス因子であることを示すものと考えられる。

A. 研究目的

HIV-1 はマクロファージを代表とする非分裂細胞にも効率よく感染を成立し得る。この理由として HIV-1 では、ウイルスゲノムを効率良く細胞核内に輸送する能力があるためと考えられているが、詳細は不明である。我々はこれまでに、HIV-1 インテグラーゼが強い核局在能を持つことを報告してきた。しかしながら、その核局在シグナル (NLS) の同定には至っていない。そこで本研究では、HIV-1 ウイルスゲノムの核内輸送におけるインテグラーゼの機能的関与をウイルス cDNA との結合能を低下させた変異体を用いて検討した

B. 研究方法

1) 変異体の作成とウイルス複製への影響:

HIV-1 インテグラーゼのウイルス cDNA 結合に関与すると考えられているアミノ酸残基 (PYNP : 142-145 位) および三つのリジン残基 (KKK : 156,157,160 位) にアミノ酸置換あるいは欠損変異を導入した新たな HIV-1 インテグラーゼの変異体を作製した。各変異の HIV-1 の感染初期過程への影響をシュドタイプウイルスによる single-round 感染系により評価した。またウイルスゲノムの逆転写過程、から組み込み過程はリアルタイム PCR 法によ

り定量解析を行った。

2) 急性感染期のウイルス cDNA の細胞内局在:

各変異体の感染細胞より核分画を抽出し、ウイルス cDNA の定量解析を行った。また、HIV-1 特異的 PNA プローブをもちいた FISH 解析よりこれらの変異体のウイルス cDNA の細胞内局在を調べた。

3) HIV-1 インテグラーゼ蛋白の生化学的解析:

各インテグラーゼ変異体蛋白の細胞内局在性への影響を GFP-インテグラーゼ融合蛋白発現系にて評価した。また、リコンビナント GST-インテグラーゼ融合蛋白を用い、急性感染細胞から回収したウイルス cDNA との結合能への影響を調べた。

(倫理面への配慮: 該当事項無し)

C. 研究結果

1) 変異体の作成とウイルス複製への影響:

ウイルス感染性を顕著 (親株比で 1%以下) に低下させる変異体 (Δ PYNP, N144Q, KKK>AAA) を得た (Fig. 1)。各変異体感染後のウイルスゲノムの逆転写過程、から組み込み過程をリアルタイム PCR 法により定量解析した結果、これらの変異体のウイルスゲノムの逆転写過程は正常であるが (Fig. 2 A)、組み込み型ウイルス DNA は検出感度以下のレベルであった (Fig. 2 C)。核内移行かつ組み込み過程阻害マーカーである 2LTR の蓄積がインテグラーゼ酵素

活性変異体 (D116G) と比較して顕著に低いことから (Fig.2B) これらの変異体 (Δ PYNP, N144Q, KKK>AAA) はウイルス cDNA の核内移行過程が阻害されていることが示唆された。

2) 急性感染期のウイルス cDNA の細胞内局在 :

各インテグラーゼ変異 HIV-1 を感染させた細胞より分離した核分画中のウイルス cDNA を定量したところ、 Δ PYNP および KKK>AAA 変異体は親株 (WT) と比べて~15%以下であった (Fig. 3A)。また、HIV-1 特異的 PNA プローブを用いた FISH 解析により、感染後 24 時間後の核内に存在するウイルス cDNA 量は Δ PYNP および KKK>AAA 変異体は親株 (WT) と比べてそれぞれ 30.1% and 26%であった (Fig. 3B)。

3) HIV-1 インテグラーゼ蛋白の生化学的解析 :

インテグラーゼ変異体蛋白の細胞内局在性を GFP-インテグラーゼ融合蛋白発現系にて評価したところ、いずれの変異もインテグラーゼの核局在能には影響しなかった (Fig. 4A)。リコンビナント GST-インテグラーゼ融合蛋白を用い、急性感染細胞から回収したウイルス cDNA との結合能への影響を pull-down 法により調べたところ、 Δ PYNP, N144Q, KKK>AAA 変異インテグラーゼ蛋白はウイルス cDNA との結合能が著しく低下 (野生型インテグラーゼ比で 10%以下) している結果を得た (Fig. 4B)。

D. 考察

HIV-1 インテグラーゼが核局在能を有するが、ウイルスゲノムの核内移行に関与しうるか否かは未だ不明である。本研究よりウイルス cDNA との結合能を低下させた HIV-1 インテグラーゼ変異体は標的細胞に感染後、ウイルスゲノムの逆転写過程 (ウイルス cDNA 合成) には影響しないが、ウイルスゲノムの核内移行過程が阻害されることを見いだした。以上の結果はインテグラーゼがウイルスゲノムの核内移行過程に関与する主要ウイルス因子であることを強く示唆する。本研究結果は今後のウイルスゲノムの核内移行過程に関与する宿主因子の同定をインテグラーゼと相互作用する宿主因子をスクリーニングするうえでの理論的基盤となるものと考えられる。

E. 結論

ウイルス cDNA との結合能が著しく低下したインテグラーゼ変異体は細胞に感染後、ウイルスゲノムの逆転写過程 (ウイルス cDNA 合成) には影響しな

いが、ウイルス cDNA の核内移行過程が阻害されることをみいだした。本結果は、インテグラーゼがウイルスゲノムの核内移行過程に関与する主要ウイルス因子であることを示す。

F. 研究発表

[論文発表]

1) Ikeda T., Nishitsuji H., Zhou X., Nara N., Ohashi T., Kannagi M., and Masuda T. Evaluation of the Functional Involvement of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase in the Nuclear Import of Viral cDNA during Acute Infection. (投稿中).

2) Nishitsuji H., Ikeda T., Miyoshi H., Ohashi T., Kannagi M., and Masuda T. Expression of small interfering RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes and Infection* (2004, in press).

3) Liu H., Ohashi T., Masuda T., Zhou X., Kubo M., and Kannagi M. Suppression of HIV-1-replication by HIV-1-irrelevant CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes resulting in preservation of persistently HIV-1-infected cells in vitro. *Viral Immunol.* 16(3), 379-391, 2003.

4) Hasegawa A., Ohashi T., Hanabuchi S., Kato H., Takemura F., Masuda T. and Kannagi M. Expansion of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) reservoir in orally infected rats: inverse correlation with HTLV-1-specific cellular immune response. *J. Virol.* 77: 2956-2963, 2003.

5) Harashima N., Kurihara K., Utsunomiya, A., Tanosaki R., Hanabuchi S., Masuda M. Ohashi T., Fukui F., Hasegawa A., Masuda T., Takaue Y., Okumura J., and Kannagi M. Reactivation of strong HTLV-1 specific CTL response in ATL patients following non-myeloablative hematopoietic cell transplantation. *AIDS*

Reserch and Human Retroviruses,
Suppl. 19:S-9, 2003.

6) Suzuki Y., Misawa N., Sato C., Ebina H.,
Masuda T., Yamamoto N. and 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* 27:2, 177-188, 2003.

[学会発表]

1) 増田貴夫 他 5 名 " HIV-1 ゲノムの核内移行
に
関与するインテグラーゼの機能モチーフと
宿主因子の探索 " 第 5 1 回日本ウイルス学会
学術集会 (京都) 2003.

2) 西辻裕紀、増田貴夫 他 4 名 "siRNA 発現レ
ンチウイルスベクターを用いた HIV-1 発現抑制"
第 51 回日本ウイルス学会学術集会 (京都)
2003.

3) 野村真知子、他 7 名 "ラットモデルにお
ける Ta に対する siRNA による HTLV-I 感染 T 細
胞の腫瘍原性の変化" 第 51 回日本ウイルス学
会学術集会 (京都) 2003.

4) 池田たま子、増田貴夫 他 5 名 "HIV-1 イ
ンテグラーゼ変異体の機能解析" 第 17 回日
本エイズ学会学術集会 (神戸) 2003.

5) 西辻裕紀、増田貴夫 他 4 名 "siRNA 発現レ
ンチウイルスベクターを用いた HIV-1 発現抑制"
第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神戸) 2003.

6) Liu H. et. al., "Reversible suppression of HIV-
1-replication by CD8+ cytotoxic T lymphocytes by
antigen-nonspecific mechanism." 第 17 回日本
エイズ学会学術集会 (神戸) 2003.

7) Zhou X et al., "Suppression of HIV-1 replication
mediated through ICOS and CD28 in CD4+T
lymphocytes." 第 17 回日本エイズ学会学術集会 (神
戸) 2003.

G. 知的所有権の出願・取得状況

無し

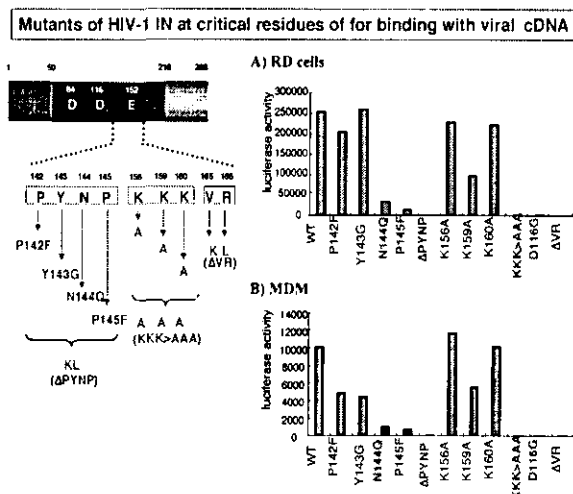


Fig. 1. Effects of HIV-1 IN mutations on the viral infectivity. Viruses were prepared by cotransfection of COS-7 cells with pNL43lucΔenv vector containing either wild type IN or a mutant IN together with an amphi-tropic Moloney MuLV envelope expression vector (pJD-1) or an HIV-1 macrophage-tropic envelope vector (pJR-FL) using Lipofectamine (Invitrogen). At 48 hr posttransfection, the culture supernatants of transfected COS-7 cells were harvested. The DNase I-treated supernatants were inoculated into 1x10⁵ RD cells, PLs and MDMs. At 4 days postinfection, the cells were washed with PBS and lysed with 200 μl of cell lysis buffer (Promega). Ten μl of each cell lysate was subjected to the luciferase assay.

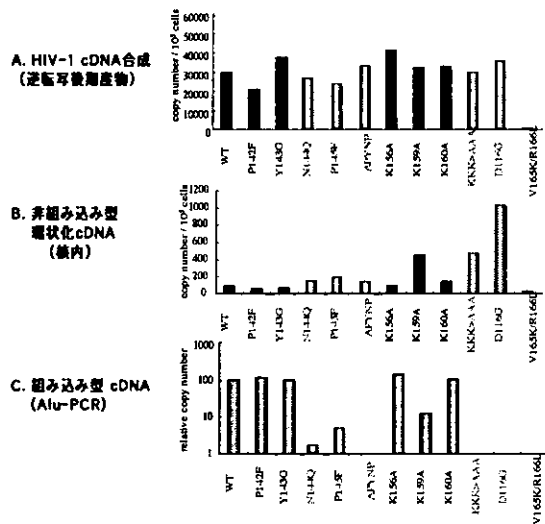


Fig. 2. Analysis of viral cDNA synthesis and proviral formation. At one day postinfection, total DNAs were extracted from infected RD cells. Each DNA sample was subjected to real-time quantitative PCR analysis using specific primer pairs for early (R/U5), late (R/gag), 2-LTR circular (2-LTR), or integrated (Alu) forms of viral cDNAs. The estimated copy number of each viral cDNA (R/U5, R/gag, 2-LTR, Alu) per 1×10^5 cell equivalent is shown. For estimation of integrated viral cDNA (Alu), each DNA sample subjected to PCR with the Alu/gag primer pair. Serial dilutions of each PCR product (Alu/gag) were subjected to real-time quantitative PCR with the R/gag primer pair. Values were calculated as the relative copy number (R/gag) of each mutant to the level of the WT taken as 100.

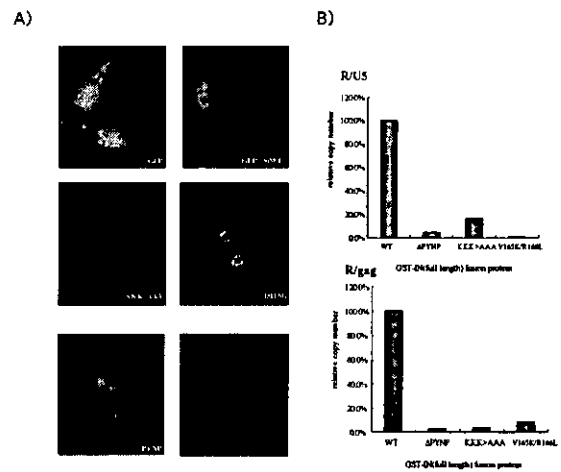


Fig. 3. Properties of HIV-1 IN mutant proteins. (A) Confocal microscopic analysis of GFP-IN fusion proteins. HeLa cells were transfected with plasmids expressing GFP only, GFP fused to full length IN (WT), or IN carrying the mutations Δ PYNP, N144Q, KKK>AAA, or V165K/R166L using Lipofectamine (Invitrogen). At 24 hr posttransfection, the cells were fixed and examined with a confocal fluorescent microscope. (B) Interactions of IN proteins with HIV-1 cDNA. Viral cDNA ($\sim 1 \times 10^5$ copies) extracted from a crude PIC fraction (see Materials and Methods) was incubated with 200 nM of each GST-IN protein (WT, N144Q, Δ PYNP, KKK>AAA) immobilized on Glutathione-Sepharose beads in binding buffer (20 mM HEPES, pH 7.3, 7.5 mM $MnCl_2$, 1 mM DTT, 10% PEG). The beads were then washed five times with wash buffer (1.0% TritonX-100 in 1x PBS) and eluted with elution buffer. The viral cDNA bound to each GST-IN protein was extracted by phenol-chloroform treatment followed by ethanol precipitation. The resulting DNA pellet was resuspended with ddw. The amount of viral cDNA in each preparation was measured by a real-time PCR system using a specific-primer pair for the late product (R/gag) of viral cDNA. The values shown are the percentage relative copy number (R/gag) of each mutant to the level of the WT taken as 100% after subtracting the background level bound to GST only.

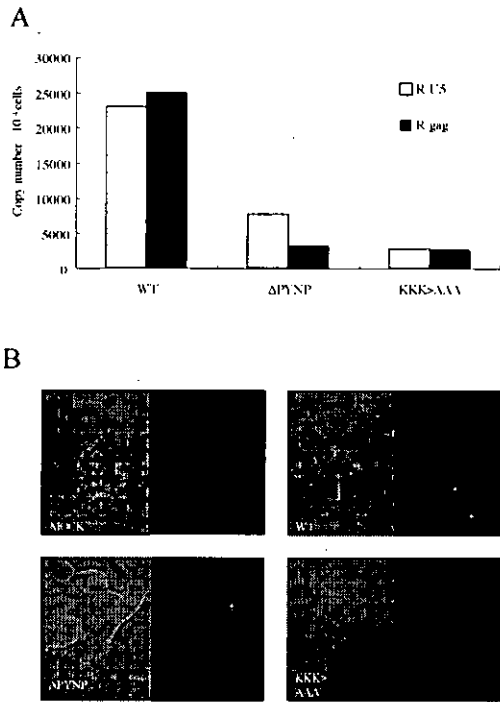


Fig. 4 Localization of HIV-1 viral cDNA after infection of each mutants. (A) Quantification of HIV-1 viral cDNA in the nuclear fraction. 5×10^7 RD cells were infected with each virus (WT, Δ PYNP or KKK>AAA). At 2 days postinfection, nuclei were isolated from the infected cells as described in the Materials and Methods. A DNA sample from each nuclear fraction pre-treated with *SacI* at 37°C overnight. The *SacI*-digested DNA sample were subjected to real-time quantitative PCR assays using the M667/AA55 (R/U5) (open bars) or R/gag (black bars) per 1×10^4 nuclei. (B) FISH with an HIV-1 PNA probe. 4×10^3 HeLa cells were seeded on the silanized glass slides. Cells were infected with each IN mutant, Δ PYNP, KKK>AAA or WT (~ 70 ng of p24). At 24 hr postinfection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde and subjected to FISH analysis using a FITC-labeled HIV-1-specific PNA probe corresponding to nt 2878 to 2994 of the *pol* region of pNL43. The signals were observed under a confocal microscope (Olympus, Tokyo, Japan). Representative medial sections were mounted using the Adobe Photoshop software.

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

11. 潜伏感染 HIV の複製誘導に関わる NF- κ B のリンフォトキシン β レセプター・シグナルによる活性化機構に関する研究

所属 : 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学
研究者 : 岡本 尚

研究要旨 HIV 複製を転写レベルで制御している NF- κ B は感染者体内で潜伏感染しているプロウイルスからのウイルスの発現に重要な役割を演じている。リンフォトキシンは2次リンパ装置の構築などに必須なサイトカインであり、従来のシグナル伝達系に拠らずに NF- κ B を活性化作用を持つ。本研究で、我々はリンフォトキシンによるシグナル伝達は IKK β によらず IKK α に依存し、NF- κ B の p65 サブユニットの転写活性化ドメインの536番目のセリンを標的とすることを初めて明らかにした。

A. 研究目的

HIV 感染者ではウイルスは樹状突起細胞やマクロファージ、および静止期 CD4 陽性 T 細胞などに潜伏感染している。最近、Izmailova ら(Nat. Med. 9:191-197, 2003) は、樹状突起細胞に感染している HIV から作られる Tat が IRF7 などの転写因子を誘導し、MCP1-3 などのケモカインを産生し、非感染 T 細胞を呼び寄せることによって感染を拡大していることを明らかにした。HIV 感染樹状突起細胞でのウイルス遺伝子発現は NF- κ B に依存しているが、そのシグナル伝達はリンフォトキシン β レセプター(LT β R)に依存する。なお、LT β R からのシグナルは2次リンパ装置の再生など免疫再構築においても重要な働きをしている。LT β R からのシグナルによる NF- κ B 活性化のメカニズムについてはまだ明らかにはなっていなかったが、NF- κ B inducing kinase (NIK)および I κ B kinase α (IKK α) を介することがノックアウトマウス等の実験から強く示唆される。そこで、本研究では LT β R シグナリングでの NF- κ B 活性化機構における NIK と IKK α の役割について検討した。

B. 研究方法

(1) 発現プラスミッドの作成：発現プラスミッド pM-p65、pM-p65(1-286)、pM-p65(286-551)、pM-p65(286-551: Δ 443-476)、pM-p65(286-520)、pM-p65(431-551)、pM-p65(521-551)、pM-p65(521-551:S529A)、pM-p65(521-551:S536A)、pcDNA3.1(-)-FLAG-p65、pcDNA3-NIK、pcDNA3-NIK(KM)、pcDNA3-I κ B Δ N、pcDNA3-I κ B

(S32A/S36A)、pCR-2FL-IKK α 、pCR-2FL-IKK α (KM)、pCR-2FL-IKK β および pCR-2FL-IKK β (KM)の作成は既に報告した方法(Jiang et al, J. Biol. Chem. 278:919-926, 2003)に拠った。

(2) 細胞株およびトランスフェクション：293細胞とLT β Rを発現するHT29細胞を用いた。プラスミッドを細胞への導入にはFuGENE6 transfection reagent(Roche Molecular Biochemicals) およびLipofectAMINE(Invitrogen)を用いた。

(3) Luciferase 検定：Luciferase(Luc)遺伝子発現プラスミッドとエフェクタープラスミッドを細胞へ導入し、48時間後、細胞から蛋白を抽出、Luc活性を測定した。

(4) 免疫組織化学染色法：p65の核移行を解析するため、HT29細胞を10ng/ml濃度のTNFで15分にまた2ug/ml濃度のLT β R agonistic抗体で40分に刺激し、細胞を固定し、p65に対する抗体(Santa Cruz Biotechnology)で染色した。

(5) ウェスタンブロット法：細胞抽出液の作成およびウェスタンブロット法は既に報告した方法(Jiang et al, J. Biol. Chem. 278:919-926, 2003)に拠った。

(6) 共免疫沈降法：p65のLT β Rシグナリングにより誘導したリン酸化を確認するため、HT29細胞にFLAG標識したp65(FLAG-p65)を発現した後、FLAGに対する抗体(anti-FLAG M2 affinity gel(Kodak))で共免疫沈降し、沈降された蛋白をp65の536番セリンのリン酸化に認識する特別抗体(anti-phospho-p65 NF- κ B (ser536) antibody (Cell Signaling))を用いてウェスタンブロット法で解析した。

C. 研究結果

(1) LT β R シグナリングでの NF- κ B 活性化は I κ B リン酸化および p65 の核移行に依存しない：293 と HT29 細胞に様々な NF- κ B 活性化因子 (TNF, LT β R, NIK, IKK α , IKK β など) を導入し、これらの因子により誘導された κ B 転写活性をみたところ、TNF, LT β R および NIK は κ B 転写活性を誘導したが、IKK α また IKK β 単独では κ B 転写活性を誘導することができなかった。さらに、TNF, LT β R シグナリングにおいて I κ B のリン酸化をウエスタンブロット法で調べたところ、TNF は I κ B のリン酸化を誘導したが、LT β R シグナリングでは I κ B リン酸化を誘導することができなかった。細胞免疫組織化学染色法で p65 の核移行を解析した結果、LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化においては p65 の核移行を伴わないで NF- κ B 依存性転写を活性化することがわかった。

(2) NF- κ B 活性化に関わる因子の相互作用：293 と HT29 細胞に様々な NF- κ B 活性化因子とそれらの dominant negative 変異体を導入し、Luciferase assay でその作用を解析した。TNF により誘導された NF- κ B 活性は NIK, IKK α また IKK β の dominant negative 変異体によって抑制された。しかし、LT β R シグナリングにより誘導された NF- κ B 活性では NIK と IKK α の変異体によって抑えられたが、IKK β 変異体では抑えられなかった。次いで、これらの因子の共同作用をみたところ、TNF は NIK, IKK β との間で共同作用がみられたが、IKK α とではみられなかった。一方、LT β R シグナリングは IKK β ではなく、IKK α および NIK との間で共同作用がみられた。以上の結果から、TNF シグナリングは主に IKK β 、すなわち I κ B リン酸化 cascade を使うが、LT β R シグナリングは主に NIK, IKK α cascade を使っていることがわかった。さらに、NIK で誘導した NF- κ B 活性における IKK α , IKK β とその変異体の作用を確認した。NIK は IKK α , IKK β 両方とも共同作用がみられた。他方、NIK で誘導した NF- κ B 活性は IKK α 変異体によって抑制されたが、IKK β によっては抑制されなかった。これらの結果から NIK の作用は IKK β でなく主に IKK α と連携していることが示された。

(3) NIK-IKK α の作用部位の同定：NIK-IKK α の作用機構をさらに確認するため、p65 wild-type と様々な変異体の Gal4 融

合蛋白の発現プラスミドを作成した。これらプラスミドを細胞に導入し、Luciferase assay でこれら Gal4 融合蛋白の NIK により誘導される転写活性を比較した。その結果、p65 の TA1 領域だけが含まれた Gal4-TA1 融合蛋白は NIK に対して一番高い反応性を示した。さらに TA1 領域の 529 番また 536 番セリンをアラニンに変換した変異体を細胞に導入し、NIK により誘導される転写活性を比較したところ、TA1 の転写活性は 536 番セリンの変異によって明らかに抑制された (図 1)。これらの結果から p65 の C-末端 TA1 領域、特にセリン 536 が NIK と IKK α の標的であることが示唆された。

(4) LT β R シグナリングにおける p65 の 536 番セリンのリン酸化：細胞に FLAG 標識した p65 (FLAG-p65) を発現し、LT β R シグナリングで誘導した p65 セリン 536 のリン酸化を共免疫沈降法で p65 を沈降しウエスタンブロット法で p65 セリン 536 リン酸化抗体を用いて確認した (図 2)。このリン酸化は NIK, IKK α 変異体また I κ B の発現によって抑制された。以上より、LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化は p65 セリン 536 の NIK および IKK α を介したリン酸化に依存していることが明らかになった。

D. 考察

今回の研究から、LT β R シグナリングにおける NF- κ B 活性化は p65 セリン 536 の NIK および IKK α を介したリン酸化に依存していることが確認された。リンフォトキシンからのシグナルは HIV 感染樹状突起細胞でのウイルス遺伝子発現のみならず、リンパ節の形成など HIV によって荒廃されたリンパ組織の再構築にも深く関与している。このシグナルがむしろ活性型 T 細胞を呼び寄せ、HIV 感染の播種に関与している可能性があるため、LT β R シグナルの選択的抑制は AIDS の進展阻止のためにも重要な標的となる。なお、最近の報告から、LT β R シグナリングは我々が今回研究対象とした NIK-IKK α を介した p65 のリン酸化 cascade 以外に、もうひとつの cascade、すなわち NIK-IKK α を介した p100-p52 processing、を誘導することが明らかになった。この一連の研究から、潜伏感染 HIV の増殖制御と AIDS 病態の進展における NIK-IKK α cascade の重要性が改めて注目される。

E. 研究発表

Jiang, X., Takahashi, N., Matsui, N., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: The NF- κ B activation in the lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J. Biol. Chem.* 278: 919-926, 2003

Jiang, X., Takahashi, N., Ando, K., Otsuka, T., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: NF- κ B p65 transactivation domain is involved in the NF- κ B-inducing kinase (NIK) pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:583-590, 2003

Matsumura, T., Degawa, T., Takii, T., Hayashi, H., Okamoto, T., Inoue, J., and Onozaki, K.: TRAF6-NF- κ B pathway is essential for IL-1-induced TLR2 expression and its functional response to TLR2 ligand in murine hepatocytes. *Immunology* 109:127-136, 2003

Okano, A., Usuda, N., Furihata, K., Nakayama, K., Tian, Q. B., Okamoto, T., and Suzuki, T.: Huntingtin-interacting protein-1-related protein of rat (rHIP1R) is localized in the postsynaptic regions. *Brain Res.* 967: 210-225, 2003

Ohata, H., Tetsuka, T., Hayashi, H., Onozaki, K., and Okamoto, T.: 3-Methylcholanthrene activates human immunodeficiency virus type 1 replication via aryl hydrocarbon receptor. *Microbiol. Immunol.* 45: 363-370, 2003

Teranishi, F., Liu, Z.-Q., Kunimatsu, M., Imai, K., Takeyama, H., Manabe, T., Sasaki, M., and Okamoto, T.: Calpain is involved in the HIV

replication from the latently-infected OM10.1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303: 940-949, 2003

Asamitsu, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., and Okamoto, T.: RING finger protein AO7 supports the NF- κ B-mediated transcription by interacting with the transactivation domain of p65 subunit. *J. Biol. Chem.* 278 : 26879-26887, 2003

Kanazawa, S., Soucek, L., Evan, G., Okamoto, T. and Peterlin, B. M. : c-Myc recruits P-TEFb for transcription, cellular proliferation and apoptosis. *Oncogene* 22: 5707-5711, 2003

Torigoe, T., Izumi, H., Yoshida, Y., Ishiguchi, H., Okamoto, T., Itoh, H., and Kohno, K.: Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP. *Nucleic Acids Res.* 31: 1-8, 2003

Ando, K., Kanazawa, S., Tetsuka, T., Ohta, S., Jiang, X., Tada, T., Kobayashi, M., Matsui, N., and Okamoto, T.: Induction of Notch signaling by tumor necrosis factor in rheumatoid synovial fibroblasts. *Oncogene* 22 : 7796-7803, 2003

Tozawa, K., Kawai, N., Hayashi, Y., Sasaki, S., Kohri, K. and Okamoto, T. : Gold compounds inhibit adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer Lett.* 196:93-100, 2003

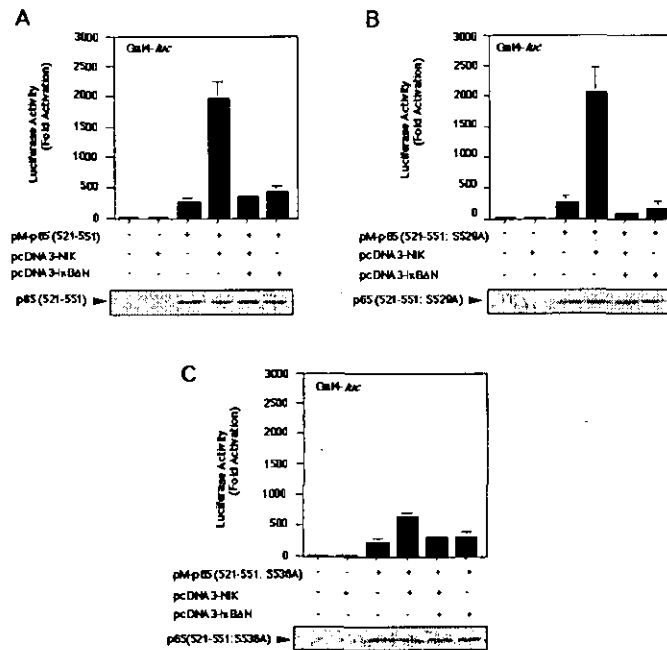


Fig. 1. Involvement of Ser536 located in p65 TA1 in the NIK-mediated transcriptional activation. Effects of mutations of Ser529 and Ser536 in TA1 domain of p65 were examined on the NIK-mediated induction of the transcriptional activity of Gal4-p65 TA1 fusion protein. 293 cells were transfected with Gal4-luc, pcDNA3-NIK, and various pM-p65 TA1 constructs including pM-p65(521-551) (A), pM-p65(521-551: S529A) (B), and pM-p65(521-551: S536A) (C). Effects of IκBΔN were also examined. Lower panels show the results of Western blotting using anti-Gal4 antibody indicating that equivalent amounts of pM-p65 TA1 and its mutants were expressed in each transfection irrespective of the cotransfection with pcDNA3-NIK or pcDNA3-IκBΔN.

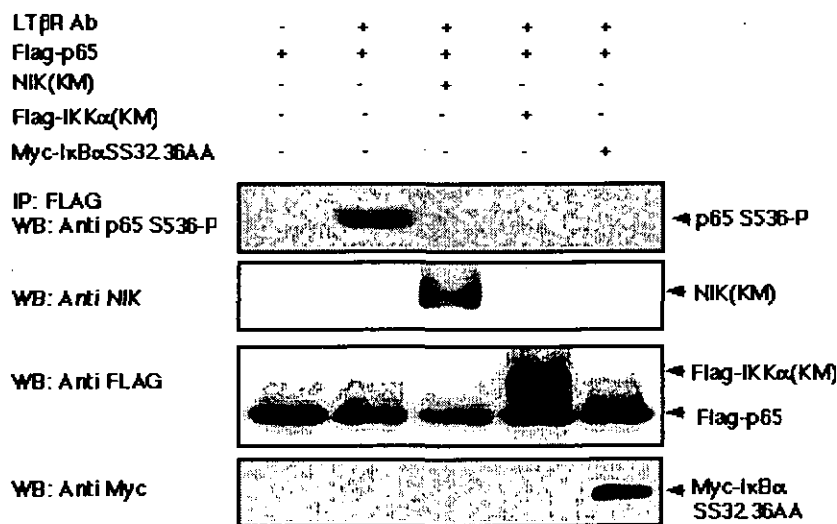


Fig. 2. Phosphorylation of p65 at Ser 536 during the LTβR signaling. Phosphorylation of p65 at Ser536 by the LTβR signaling. HT29 cells were co-transfected with various combinations of plasmids expressing Flag-tagged p65 (Flag-p65), NIK(KM), Flag-tagged IKκ(KM) and Myc-tagged IκBα(SS32.36AA). After stimulation with agonistic anti-LTβR mAb for 40 min, cell extracts were prepared and immunoprecipitated with anti-Flag M2 affinity gel. The immunoprecipitates were fractionated by SDS-PAGE and immunoblotted with anti-phospho-p65 NF-κB (Ser536) antibody (upper panel). Lower panels show the immunoblotting detection of NIK(KM), p65, IKκ(KM), and IκBα(SS32.36AA) proteins by respective antibodies.

12. T細胞サブセットと HIV-1 トロピズム

研究要旨 AIDS 病態進行とともに、HIV-1 感染者の CD38+ T 細胞の割合は病態進行とともに増加することが知られている。私たちは、健常者の PBMC に由来する CD4+ T 細胞を CD38 サブセットに分画後、それぞれが感受性を示す HIV-1 トロピズムについて検討してきた。その結果、CD38+分画は X4 HIV-1 に高感受性を示すこと、この高感受性には自ら産生する IL-4 が関わっていること、X4 HIV-1 の吸着・侵入、インテグレーションまでの過程には両サブセット間で大きな違いが認められなかった。そこで、本年度はインテグレーション以降の過程における差異を中心に検討した。その結果、転写の過程で、両サブセット間で顕著な差異が生じていること、転写因子としての AP-1 が CD38+サブセットに IL-4 依存的に活性化されており、CD38-サブセットにはこの活性化が認められないこと、一方、NF- κ B や STAT-6 の活性化程度には両サブセット間で差異は認められなかった。

分担研究者 生田和良

(大阪大学微生物病研究所・教授)

協力研究者 李永剛、岩部幸枝、木ノ本正信、

Jiranan Warachit、李桂梅、

辻祥太郎

(大阪大学微生物病研究所)

細胞サブセットは R5 HIV-1 に高感受性を示した。一方、CD4+CD38+と CD4+CD38-サブセットの表面抗原を比較した結果、CD4、CXCR4 発現には両サブセット間で差は認められなかったが、CCR5 陽性細胞の割合は CD38-サブセットでやや高かった。

CD38+ T 細胞サブセットにおける X4 HIV-1 の高複製機序について検討したところ、本 T細胞サブセット自ら産生する IL-4がこの X4 HIV-1 複製能の高さに関わっていること、X4 HIV-1 感染後のインテグレーションまでの過程では両サブセット間で大きな差異が認められないことを見出してきた。そこで、本年度は、その後の転写過程に絞った解析を行った。

A. 研究目的

AIDS 病態機序には、HIV-1 の主な標的細胞である CD4+ T 細胞のウイルス感受性（トロピズムと複製効率）が関わると考えられる。一般に、Th1 細胞は R5 HIV-1 に、逆に Th2 細胞は X4 HIV-1 に高感受性を示すことが報告され、これはコレセプター発現程度の違いによって説明されている。しかし、naïve T と memory T 細胞の HIV-1 感受性については一致した結果になっていない。

私たちは、AIDS 病態進行とともに、CD38+ T 細胞の割合が上昇する点に着目し、この CD4+CD38+と CD4+CD38- T 細胞サブセットが感受性を示す HIV-1 トロピズムについて検討している。その結果、CD4+CD38+ T 細胞サブセットは X4 HIV-1 に、逆に CD4+CD38- T

B. 研究方法

非感染ドナーの PBMC から MACS を用いて、活性化マーカー CD25 陰性、HLA-DR 陰性の CD4+CD38+および CD4+CD38-サブセットを分離した。

各サブセットへのウイルス感染には、それぞれの分画 1×10^6 に対し、X4 HIV-1 (NL4-3) を 37°C、1 時間吸着させ、IL-4 (または PHA)

及び IL-2 存在下で 3 日間、さらに IL-2 存在下で 8~9 日間培養を行った。また、両分画を IL-4 (または PHA) であらかじめ 3 日間前処理した後に、同様の条件で HIV-1 感染した。

また、VSV-G 発現ベクターと cotransfection することにより作製した VSV-G-pseudotype HIV-1 ウイルス (pNL4-3 由来の、*nef* 遺伝子に luciferase 遺伝子を挿入) を用いて、CD38 サブセットへの感染実験を行った。

細胞の活性化状態は細胞表面 CD25 発現程度を、また細胞の増殖性については細胞内 Ki-67 発現程度を、それぞれフローサイトメトリーによる解析により判定した。

転写因子 (NF- κ B、STAT-6、AP-1) の活性化程度については、ゲルシフトアッセイ、ウェスタンブロット法にて検討した。

C. 研究結果

1) CD4+CD38+ および CD4+CD38- T 細胞サブセットを、あらかじめ IL-4 で 3 日間刺激を加えた後に X4 HIV-1 で感染したところ、CD38+ T 細胞の方が顕著にウイルス産生を行った。一方、IL-4 の代わりに PHA にて 3 日間刺激を加えた後に X4 HIV-1 で感染したところ、CD38-であっても CD38+と同程度の高感受性 (ウイルス産生) を示した。

2) IL-4 刺激した CD38 サブセット間では、細胞の増殖性や活性化程度に明瞭な差異が認められないことが、CD25、Ki-67 発現におけるフローサイトメトリー解析および細胞の凝集塊形成率比較により明らかになった。PHA 刺激した CD38 サブセットでは、CD25 及び Ki-67 発現の亢進が認められたが、CD38+、CD38-サブセット共に同程度の亢進であった。

3) X4 HIV-1 の吸着率も両 CD38 サブセット

間で差異が認められず、また Alu-PCR 解析により検討したインテグレーション効率においても両 CD38 サブセット間で差異が認められなかった。

4) ウイルス転写効率に関して解析したところ、CD38+サブセットは、CD38-サブセットより、顕著に高いことが明らかになった。すなわち、RT-PCR 法を用いたウイルス mRNA 量比較、VSV-G との pseudovirus による感染実験結果から、両サブセット間の感受性の違いは、ウイルス転写過程に起因していることが判明した。

5) そこで、各種転写因子の IL-4 処理後の活性化程度について検討した。その結果、STAT-6 のリン酸化は、CD38+および CD38-の両サブセットで IL-4 処理後に同程度に認められた。また、NF- κ B の活性化も両 CD38 サブセットで同程度に認められることがゲルシフトアッセイで明らかとなった。一方、AP-1 の活性化は、CD38+サブセットに有意に高い活性化が IL-4 処理後に認められ、CD38-サブセットでは IL-4 処理後においても認められなかった。

6) ヒトゲノム遺伝子約 40,000 個の GeneChip 解析により、IL-4 処理 CD38+サブセットに認められ、IL-4 未処理 CD38+サブセットと IL-4 処理 CD38-サブセットに認められないものとして約 20 遺伝子が、反対に IL-4 処理 CD38-サブセットに認められ、IL-4 未処理 CD38-サブセットと IL-4 処理 CD38+サブセットに認められないものとして 4 遺伝子が同定できた。

7) GeneFishing™ DEG 101 キットを用いた解析により、IL-4 処理 CD4+CD38-サブセットにのみ検出される宿主細胞転写物として、2 遺

伝子が特異的に検出された。

D. 考察

CD4+CD38+サブセットは X4 HIV-1 に高感受性であり、その機序として、本サブセット自ら高産生する IL-4 がウイルス産生の亢進に関わっていた。この高産生は、HIV-1 のレセプターおよびコレセプターの発現が関わるウイルス吸着・侵入段階の促進ではなく、恐らく転写過程の亢進に基づいていると考えられた。この CD38+サブセットにおける X4 HIV-1 産生に導く転写活性化には、STAT6 や NF- κ B には重要性が認められず、AP-1 の関わりが強く示唆された。

これまでに GeneChip 法で CD4+CD38+サブセット特異的遺伝子産物として約 20 個、CD4+CD38-サブセット特異的遺伝子産物として 4 個に、また、GeneFishing 法で CD4+CD38-サブセット特異的遺伝子産物として新たにほぼ 2 個に絞ることができた。これらの遺伝子の関わりについて今後検討することにより、X4 HIV-1 複製の遮断法の開発への道が拓けると期待される。

E. 結論

HIV-1 の標的である CD4+ T 細胞のうち、CD38+サブセットは、IL-4 刺激により X4 HIV-1 の転写過程を亢進する因子を誘導し、一方および CD38-サブセットはこの亢進が認められないか、これを積極的に妨げる因子を誘導する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Komoto, S., Tsuji, S., Ibrahim, M. S., Li, Y.-G., Warachit, J., Taniguchi, K. and Ikuta, K.; The Vpu protein of human immunodeficiency virus type 1

plays a protective role against viral induced apoptosis in primary CD4⁺ T lymphocytes. *J. Virol.* 77, 10304-10313, 2003.

2. 学会発表

岩部幸枝、李永剛、木ノ本正信、Jiranan Warachit, Madiha S. Ibrahim, 辻祥太郎、生田和良. T 細胞サブセット (CD4+CD38+と CD4+CD38-) 間の X4 HIV-1 感受性の比較第 17 回近畿エイズ研究会学術集会, 2003.

Jiranan Warachit, 李永剛、河本聡志、木ノ本正信、岩部幸枝、Madiha S. Ibrahim, 辻祥太郎、生田和良. HIV-1 サブタイプ B 型と AE 型間のウイルス学的性状の比較. 第 17 回近畿エイズ研究会学術集会, 2003.

李永剛、木ノ本正信、Jiranan Warachit, Madiha S. Ibrahim, 岩部幸枝、辻祥太郎、生田和良. シンシチウム形成能の高い非感染性 HIV-1 粒子の Env 機能解析. 第 17 回近畿エイズ研究会学術集会, 2003.

李永剛、木ノ本正信、Jiranan Warachit, 岩部幸枝、Madiha S Ibrahim, 辻祥太郎、亀岡正典、生田和良. Latency of Human Immunodeficiency Virus Type 1 with CXCR4-usage in Primary T-cell subset CD4+ CD38- Phenotype. 第 51 回日本ウイルス学会. 2003.

河本聡志、直江真理、辻祥太郎、Jiranan Warachit, 小島洋子、佐々木潤、長嶋茂雄、大竹徹、谷口孝喜、生田和良. HIV-1 Vpu アポトーシス誘導能の細胞種依存性. 第 51 回日本ウイルス学会. 2003.

木ノ本正信、向井徹、李永剛、徳永研三、
辻祥太郎、佐多徹太郎、後藤俊幸、生
田和良. シンシチウム形成能の高い非
感染性 HIV-1 粒子の Env 機能解析. 第
51 回日本ウイルス学会. 2003

木ノ本正信、向井徹、李永剛、辻祥太郎、
徳永研三、佐多徹太郎、後藤俊幸、生田
和良. 高いシンシチウム形成能を規定す
る Env 呂四季の同定. 第 17 回日本エイ
ズ学会. 2003.

岩部幸枝、李永剛、木ノ本正信、Jiranan
Warachit、Madiha S Ibrahim、辻祥太郎、
生田和良. Establishment of HIV-1 latency in
Primary T-cell subsets. 第 17 回日本エイズ
学会. 2003.

Jiranan Warachit、李永剛、河本聡志、木ノ本
正信、岩部幸枝、Madiha S Ibrahim、辻
祥太郎、生田和良. Difference in the
virological ciewria of HIV-1 between
subtype B and CRF01_AE. 第 17 回日本
エイズ学会. 2003.