

Fig.1. Expression and purification of HIV-1 RT.
 HIV-1 RT p66-p51 heterodimers corresponding to the peak of RT activity were purified from the E.coli lysates by affinity chromatography (HiTrap Chelating HP, Amersham Biosciences) and size exclusion chromatography (HiLoad 16/60 Superdex 200 pg, Amersham Biosciences). All of the purification processes were carried at 4°C. **A.** An example of elution pattern of RT by size exclusion chromatography. **B.** SDS-polyacrylamide gel analysis of fraction 31-33 of wild type (WT) and multiple drug resistant mutant (mt6) RT. Mt6 RT has an 11 amino acid insertion mutation and 4 point mutations on the WT RT.

Table 1. Sensitivity of RTwt, RTmt2 and RTmt6 to nucleotide analog RT inhibitors

RT ^b	IC ₅₀ (μM) (fold increase) ^a of :					
	AZTTP	d4TTP	ddATP	ddTTP	ddGTP	ddCTP
93JP-NH1	0.07	0.05	0.07	0.09	0.05	0.04
ERT-mt2	0.10 (1.4)	0.07 (1.4)	0.11 (1.6)	0.22 (2.4)	0.07 (1.4)	0.04 (1.0)
ERT-mt6	0.31 (4.4)	0.16 (3.6)	0.24 (3.4)	0.30 (3.5)	0.15 (3.0)	0.07 (1.8)

^a fold increase in IC₅₀ (mt2 / WT and mt6/WT)

^b ERT-mt2; 93JP-NH1 with an 11 amino acid insertion mutation, ERT-mt6; 93JP-NH1 with an 11 amino acid insertion mutation and 4 point mutations. ERT-mt2 virus was as sensitive to the RT inhibitors as 93JP-NH1 was, while ERT-mt6 virus exhibited a high level of multiple nucleoside resistance (Sato et al JV 2001).

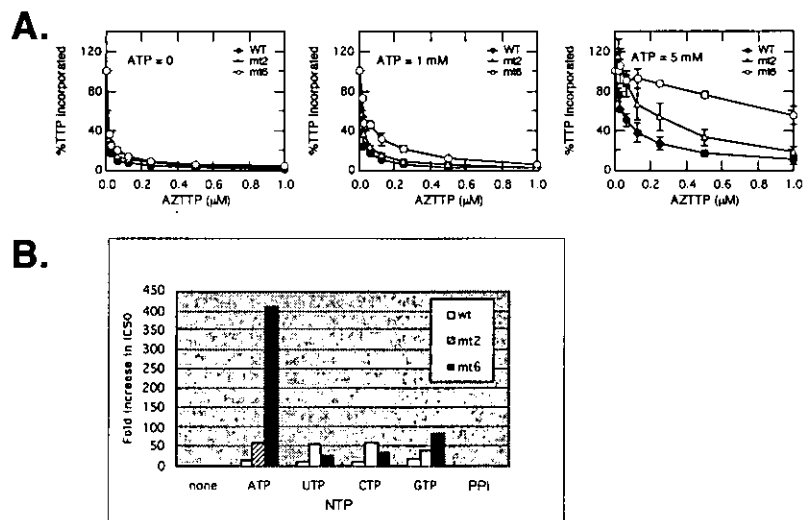


Fig.2. Effects of NTP on IC₅₀ of AZTTP.

A. RT assay using [α-³²P]dTTP and Poly(rA) p(dT)₁₂₋₁₈ was done in presence of increasing amount of AZTTP and 0mM (left), 1mM (middle) or 5mM (right) of ATP. **B.** AZTTP concentrations inhibiting 50% of the [α-³²P]dTTP incorporation of the drug free control (IC₅₀) were determined on the basis of the dose response curve. IC₅₀s for sample with 5 mM of indicated nucleotide triphosphate (NTP) or pyrophosphate were determined, and fold increases compared to the IC₅₀ for sample without NTP are indicated..

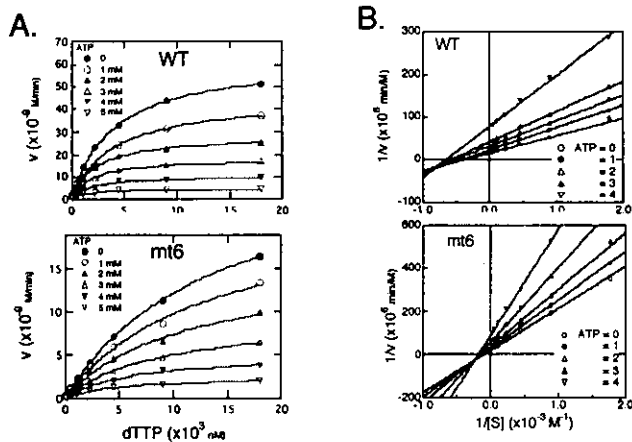


Fig. 3. Effects of ATP on kinetics of dTMP incorporation into poly(rA) p(dT)₁₂₋₁₈. A. [S]v curve in the presence of increasing concentrations of ATP. RT assay using [³²P]dTTP and poly(rA) p(dT)₁₂₋₁₈ was done in presence of increasing amount of ATP (0, 1, 2, 3, 4 mM). Initial velocities of dTMP incorporation are shown at various dTTP substrate concentrations. B. Lineweaver-Burk plots of ATP inhibition. The data are presented in a double reciprocal plot.

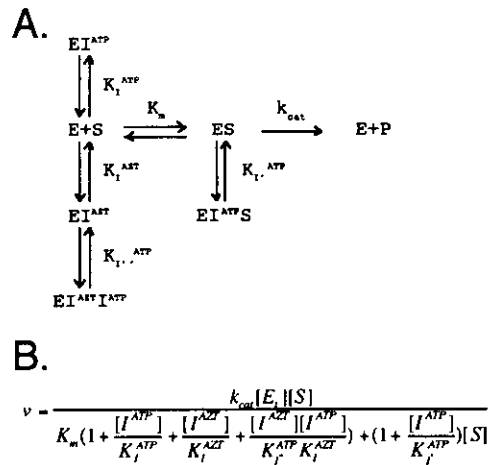


Fig. 4. A Kinetics model and equation for calculating K_i^{AZTP} and K_i^{d4TTP} in the presence of ATP. A. Based on the kinetics data described in Fig. 3, a simplified kinetics model were hypothesized, in which ATP functions as a non-competitive inhibitor and nucleoside analogs function as competitive inhibitors. B. The initial velocity expression that can be derived from the model is, where K_i^{ATP} is the dissociation constant of ATP; K_i^{AZTP} is the dissociation constant of AZTP; $[I^{ATP}]$ is ATP concentration; $[I^{AZTP}]$ is AZTP concentration.

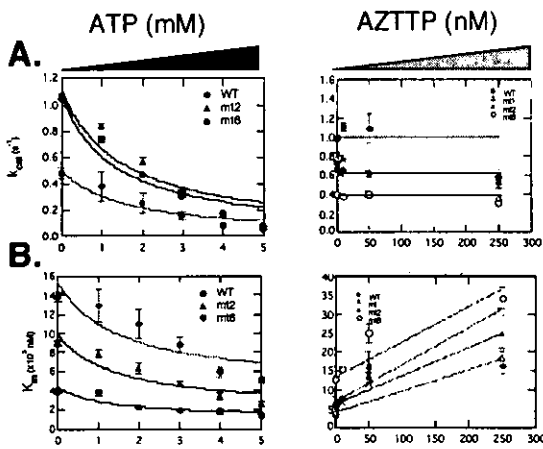


Fig. 5. Effects of ATP and AZTP on K_m and k_{cat} of RT. RT assay using poly(rA) p(dT)₁₂₋₁₈ was done with RT (1-10nM) and various concentrations of dTTP (0.2-18μM) in the presence of increasing concentrations of ATP (0, 1, 2, 3, 4, 5mM) or AZTP (0, 0.4, 2, 10, 50, 250μM). The apparent K_m (A) and k_{cat} (B) values under the RT inhibitors were determined with equations from Michaelis-Menten-equation based model (Fig. 4) and confirmed by Lineweaver-Burk plot analyses. A representative results of three independent experiments is indicated.

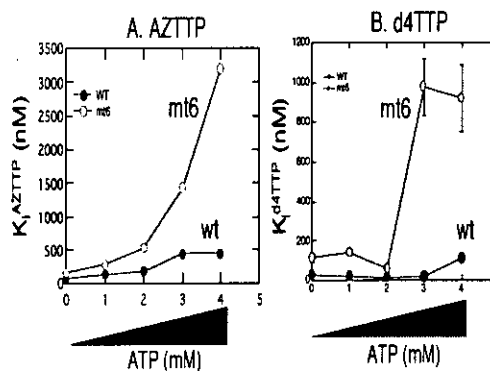


Fig. 6. Effects of ATP on K_i of AZTP and d4TTP. RT assay using poly(rA) p(dT)₁₂₋₁₈ was done with RT (1-10nM), various concentrations of dTTP (0.2-18mM), various concentrations of AZTP or d4TTP (0, 0.4, 2, 10, 50, 250mM), and in the presence of increasing concentrations of ATP (0, 1, 2, 3, 4, 5mM). The apparent K_i values of the AZTP and d4TTP in the presence of ATP were calculated with equations from Michaelis-Menten model and confirmed by Lineweaver-Burk plot analyses. A representative results of three independent experiments is indicated.

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

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

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部 室長

研究要旨 HIV-1 粒子の発芽直後にはゲノム RNA にニックが生じる。このフラグメント化と複製の関係を調べたところ、フラグメント化の著名な上昇に比べ感染性がよく保たれていることが判明し、ゲノム RNA の修復機構の存在を示唆した。フラグメント化と修復機構は低安定なサイトカイン mRNA の制御に共通していると推測された。粒子中のゲノム RNA のフラグメント化と修復が明らかとなったためゲノム組換えへの影響を調べたが、発芽以降に起きる組換えに影響を及ぼす宿主因子を見出すことはできていない。

A. 研究目的

ウイルス粒子発芽前後における HIV-1 ゲノム RNA の性状変化と感染性の関係を最初に調べた。またゲノム RNA のフラグメント化と修復機構を低安定な GM-CSF mRNA を通じて調べた。さらにゲノムの組換えをアッセイする方法を試みた。本研究の結果は、ウイルス複製やゲノム組換えの制御の解明につながると考えられた。

B. 研究方法

HIV-1 は発芽後ゲノム RNA にニックが入りフラグメント化していることが判明した。このニックが感染性に与える影響を調べた。

- (ア) 5 分間に発芽した HIV-1 の粒子 RNA を経時的に RT-PCR にて定量した。
- (イ) 上記のウイルスの感染性をそれぞれルシフェラーゼ活性により測定した。

一方、フラグメント化と修復を通じた RNA の安定化機構を調べるために低安

定な mRNA として代表的な GM-CSF

mRNA の 3' 側にある AU-rich element (ARE) を用いて HIV-1 粒子内へ RNA を認識して取り込まれると考えられる topoisomerase I の作用を調べた。

- (ウ) テトラサイクリンで転写をコントロールする TRE プロモータ下流にルシフェラーゼ cDNA と GM-CSF RNA ARE をおいたベクターを含む HeLa 細胞を作製した。
- (エ) テトラサイクリンにより転写を停止し、ルシフェラーゼ RNA のコピー数を RT-PCR により経時的にモニターした。
- (オ) Topoisomerase I または RNA ライゲース活性を失ったミュータントを発現し、RNA 安定性への影響を調べた。
- (カ) ウイルス産生細胞において発現させた topoisomerase I とミュータントがゲノム組換えへ影響を及ぼすかどうかを調べた。薬剤耐性遺伝子及び GFP 遺伝子をそれぞれゲノム

とする HIV-1 ベクターを作成した。それぞれの遺伝子にミューテーションを加えサイレントにした。感染細胞の薬剤耐性コロニーのうち蛍光発光するコロニーの比率を遺伝子が修復されてできたコロニーであると考えゲノム組換えの比率とした。

本研究では特に臨床試料を使用していない。

C. 研究結果

- (ア) 発芽後 8 時間で、gag 部分の RNA コピー数は 3 割程度まで減少していた。粒子中のゲノム RNA のうち完全な分子は 1 割以下であると推測した 図 1。
- (イ) 逆に感染性は 7 割程度保たれていた 図 1。
- (ウ) 合成 ARE RNA は HIV-1 p7 RNA 同様、UA 間でのみ切断されていた 図 2。
- (エ) Topoisomerase I の RNA ライゲースを欠くミュータント (R488A, K532A) 発現によりルシフェラーゼ RNA のコピー数は著明に減少することが判明した 図 3。
- (オ) 組換えを調べる HIV-1 ベクターウイルス産生細胞において topoisomerase I のドミナントネガティブの発現は組換え効率に影響を及ぼさなかった。

D. 考察

粒子中 RNA コピー数と感染性の比較

から、粒子中でニックが入ったウイルスゲノム RNA は細胞へのエントリー後に、修復される可能性が強いと考えられた。合成 GM-CSF ARE も HIV-1 RNA 同様の脆弱性を示し、RNA の切断点は UA 間であった。細胞においては ARE を含む RNA の安定性は HIV-1 RNA と同様に、topoisomerase I によって調節されていた。以上より HIV-1 RNA は細胞の RNA 制御機構と共通する機構によって守られていると考えられた。今回のアッセイ系では topoisomerase I の RNA ライゲース活性が組換えへ影響を及ぼしている証拠は得られなかった。本機構を標的とした阻害剤の選択はウイルス因子と宿主因子の相互作用を標的とする、耐性株の出現しにくい抗 HIV-1 剤開発へつながっていくと考える。

E. 結論

HIV-1 のゲノム RNA は発芽と共にニック生じるが topoisomerase I によって修復されると考えられた。細胞の低安定な mRNA の制御と共通の機構が HIV-1 複製に関与していると想定された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima, N., P. Ionescu, Y. Sato, M. Hashimoto, T. Kuroita, H. Takahashi, H. Yoshikura, and T. Sata. 2003. In Situ Hybridization AT-Tailing with Catalyzed Signal

Amplification for Sensitive and Specific in Situ Detection of Human Immunodeficiency Virus-1 mRNA in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissues. *Am J Pathol* **162(2)**: 381-389

2. **Shoya, Y., K. Tokunaga, H. Sawa, M. Maeda, T. Ueno, T. Yoshikawa, H. Hasegawa, T. Sata, T. Kurata, W.W. Hall, B.R. Cullen, and H. Takahashi.** 2003. Human topoisomerase I promotes HIV-1 proviral DNA synthesis: implications for the species specificity and cellular tropism of HIV-1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100(14)**: 8442-8447

3. **Watanabe, I., T.M. Ross, S. Tamura, I. Ichinohe, T. Ito, H. Takahashi, H. Sawa, J. Chiba, T. Kurata, T. Sata, and H. Hasegawa.** 2003. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine* **21(31)**: 4532-4538

4. **Ueno, T., K. Tokunaga, H. Sawa, M. Maeda, J. Chiba, A. Kojima, H. Hasegawa, Y. Shoya, T. Sata, T. Kurata and H. Takahashi.** Nucleolin and the packaging signal, y promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiology and Immunology*, in press.

5. **Takahashi, H., H. Sawa, H. Hasegawa, K. Nagashima, T. Sata**

and T. Kurata. 2004.

Topoisomerase I dissociates human Immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) reverse transcriptase from genomic RNAs. *Biochem Biophys Res Commun* **313**:1073-1078

2. 学会発表

高橋秀宗、前田才恵、佐多徹太郎 HIV-1 RNA 安定性制御機構の解析 第 51 回 日本ウイルス学会総会 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案登録 特になし
3. その他 特になし

図 1 発芽後の粒子 RNA コピー数と感染性の比較

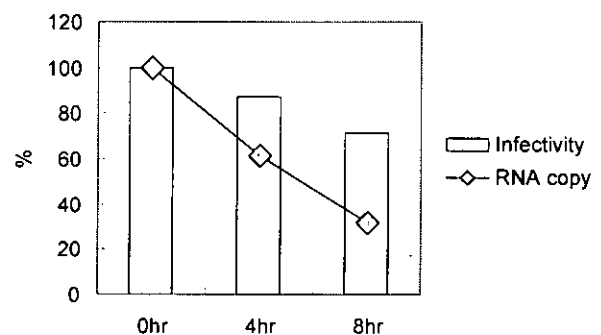


図2 合成 GM-CSF ARE RNA の切断点

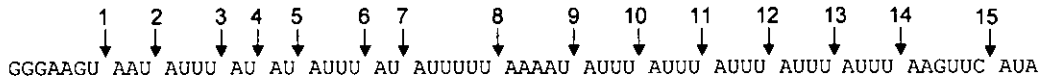
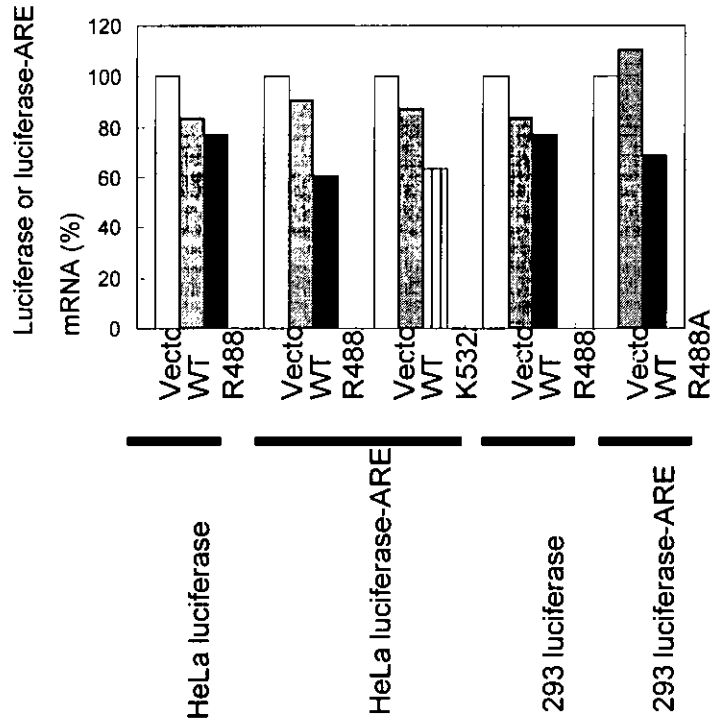


図3 293T 及び HeLa 細胞における topoisomerase I (WT)とドミナントネガティブ (R488A, K532A) 発現のルシフェラーゼ RNA または ARE を有すルシフェラーゼ RNA コピー数への影響



20. HIV ゲノムの二量体化に関する研究

分担研究者 櫻木淳一（大阪大学微生物病研究所 ウイルス感染制御分野）

研究要旨

分担研究者が独自に構築した、HIV-1 ウイルス粒子中のゲノム二量体化を効果的に検出できるシステムを用いて、二量体化領域の構造についての詳細な機能相関を明らかにすることに取り組んだ。その結果ウイルス粒子内でゲノム二量体化シグナルが働くためには、今まで *in vitro* の実験系で明らかにされてきた領域より広く、かつ複雑な範囲が必要であることが明らかとなった。また、このシステムを応用して、ウイルス組み換え体生成の素過程と考えられる HIV-1 サブタイプ間ヘテロゲノム二量体化の効率を測定することにも成功し、ヘテロ二量体化しやすいサブタイプの組み合わせが存在することが示唆された。

A, 研究目的

HIV-1 を含むレトロウイルスのポジティブ一本鎖 RNA ゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成している。これは遺伝子組替えによって子孫に遺伝的多様性をもたらし、また片方のゲノムが傷ついていた時の補償をすることで、生き残りに有利な状況を作り出していると解釈されている。したがって HIV ゲノム二量体化の機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としている HIV の制圧に向けた糸口を示しうる。現在までにゲノム上の二量体化シグナル (DLS) の同定は多くの場合人工的に合成した RNA を用いた試験管内の系により行われており、パッケージングシグナル内に存在することが示唆されている (E/DLS 領域と総称する)。しかし実際のウイルス粒子中では多くの因子やイベントが存在しており、RNA と緩衝液のみからなる試験管内の系の結果がそのまま当てはまるとは限らない。しかし、DLS がパッケージングシグナル内に位置するということは、ゲノム二量体化のウイルス粒子を用いての解析を困難にしている。それは二量体化の機能解析のために E/DLS へ変異導入をおこなうことは同時にパッケージング能へも影響を与えることになり、見える結果を単純に解釈できないからである。そこで、本研究では HIV-1 ゲノム二量体化をパッケージングと独立した形で粒子内でとらえること

を目指し、E/DLS を含むと考えられる領域をゲノム上に複数個配置することによって起こる二量体の量的・質的变化について解析を行った。さらに近年注目されているウイルスサブタイプについての解析も試みた。

B, 研究方法

1, DNA 構築

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。ゲノムの転写開始点から下流へ約 500 塩基分までの DNA 断片を切り出し、polyA 付加シグナルとプライマー結合領域 (PBS) を不活化する変異を導入した (ΔP 断片)。pNL43 の Env 領域に ΔP 断片を挿入した変異体 pDDNBA を作成した。pDDNBA を母体として 5' 側・3'側の E/DLS にそれぞれ様々な変異を導入した一連の変異体を作成した。また、HIV-1 サブタイプに関する解析のために HIV-1 サブタイプ A/G, C, E の各感染性クローンを国立感染研の巽・佐藤先生、阪大微研の生田・松田先生よりご分与いただき、これらのパッケージング・二量体化シグナル領域もそれぞれサブクローニングしたのち pNL43 に組み込み、キメラクローンを作成した。pNL43 のパッケージングシグナル付近 400 塩基と、Pol 領域 300 塩基を RNA 合成用ベクター pGEM3ZF(+) に挿入したプラスミド (pGEM600-1000, pGEMpol) を作成し、放射性リン標識 RNA プロブの鋳型とした。

2, ウイルスの精製

ヒト腎臓由来 293T 細胞にプロウイルス型 DNA をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。48 時間後に細胞上清に放出されたウイルス粒子をシュークロースクッションを通した超遠心にて回収した。ウイルスの一部を界面活性剤にてウイルスを溶解、プロテイナーース K 処理、フェノール抽出にてウイルス粒子由来 RNA を精製した。トランスフェクトした細胞も同時に回収し、細胞質 RNA を精製した。ウイルス量は p24 抗原 ELISA キットにて定量した。ウイルスタンパクの性状は HIV-1 特異的抗体とウェスタンブロット法にて確認した。

3, ノザンハイブリダイゼーション

回収したウイルス RNA を 5 等分し、それぞれ 25, 35, 45, 55, 65°C で 10 分間加温したのち非変性 TBE アガロースゲルにて泳動した。ナイロン膜に電気的に転写した後固定し、RNA プローブを用いて HIV-1 ゲノム RNA を可視化した。

4, RNase プロテクション

ウイルス RNA と細胞質 RNA 中の HIV-1 ゲノム RNA を RNA プローブを用いて RNase プロテクションアッセイキットにて定量した。

C, 研究結果

1, HIV-1 RNA 5' 領域のウイルス粒子内ゲノム二量体化に対する役割

HIV-1 の E/DLS 領域を、通常的位置に加えてもう一つゲノム上に持つ変異体 DDNBA を作成し、これより産生されたウイルス様粒子内のゲノムの二量体化度合いを野性株のそれと比較した。野性株ではほぼ 100% のゲノムが非変性条件下で二量体化しているのに対し、DDNBA のゲノムは 40% 前後のゲノムが単量体として存在していた。これは同一 RNA 上の二つの E/DLS の分子内反応により分子間での二量体形成が阻害された結果一部のゲノムが単量体化するためと考えられた。DDNBA の片方の E/DLS に変異導入を行い、それが二量体化を阻害する変異だった場合は粒子内の単量体形成が阻害される。その変異が同時にパッケージング能に影響するものだったとしても変異導入していない側の E/DLS からパッケージング能は供給され、パッケージングへの影響は免れるた

め、この変異体の粒子内単量体形成の度合いを調べることで DLS をパッケージングシグナルと切り離して解析することが可能となる (図 1)。これまでにこの系を用いてゲノム二量体化の必要領域についての詳細な解析を行ってきた。今年度はさらに必要十分領域を同定することを目的として、DDNBA を母体に 3' 側の E/DLS (挿入した方の配列) を徐々に狭めた一連の変異体を作成し、解析を行った。その結果粒子内ゲノム二量体形成機能には、5' 末は R/U5 と U5/L の 2 つのステムループの間に存在する 7 塩基のジャンクション部から、3' 末は gag 蛋白開始点付近の SL4 までを含む約 280 塩基からなる範囲の RNA が十分であることが明らかとなった。次にこの範囲内での必要領域を明らかにするために範囲内の RNA ステムループ群を一つずつ削除した変異体を用いてゲノム二量体化効率を調べたところ、SL1, SL2, SL4 は二量体化に必要であったが、スプライシングドナーが載っている SL2 は不要であった。以前の解析で PBS ループや U5/L ステムループの上部ステムも二量体化に不要であることが示されているので、結果として図 2 に示す領域 (Lp4 Δ2 断片) が粒子内ゲノム二量体化を起こさせるのに必要十分な領域と考えられた。二量体化シグナルを削除した HIV-1 変異体のゲノム上 2 カ所に Lp4 Δ2 断片を挿入することで、単量体ゲノムのみを持つウイルス粒子を産生する変異体を作成できたことからこの領域の持つ RNA 二量体化能が示された。

2, HIV-1 ビリオン中におけるサブタイプ間のゲノムヘテロ二量体化効率比較の試み

現在までに世界各地から 10 種を越える HIV-1 サブタイプの分布が報告されている (図 3 a)。加えて、サブタイプ間の流行組み換え体に関する報告も増え続けている。この組み換えウイルスはウイルスゲノムの粒子中でのヘテロ二量体化の結果と考えられるが、これについての詳しい解析は技術的に困難でもあり今までになされていない。そこで我々の構築した系を用いることで簡便かつ明確にヘテロ二量体化効率の測定が可能になることが期待された (図 3 b)。

サブタイプ A/G, C, A/E の各感染性 DNA クロームを用いて、サブタイプ B の結果を基に各サ

ブタイプの二量体化シグナルの十分領域をサブクロニングした。これらの断片をサブタイプBであるNL43由来のDDNBA型変異体、DDNL4Hをバックボーンとしてこれの5'側、3'側、あるいは両側DLSに様々な組み合わせで配置した一連の変異体を作成した。これらを用いて各サブタイプ間のゲノム二量体化についての解析を行った。サブタイプA/G,Cのホモ二量体化効率はサブタイプBと同様の高さであり、サブタイプBを用いて決定した二量体化シグナル十分領域がサブタイプA/G,Cでも同様であることが明らかとなった。これに対しサブタイプA/Eではホモ二量体化が起こらず、このサブタイプではシグナル領域にずれがある可能性が考えられた。ヘテロ二量体化に関しては、サブタイプA-B, B-C間の効率が悪かったのに対し、サブタイプA-C間はホモ二量体化と同等の効率を示し、ヘテロ二量体を作りやすいサブタイプの組み合わせがあることを示唆していた (図3c)。

D, 考察

HIVのウイルス粒子内でRNA一本鎖ゲノムは非共有的に結合した二量体として存在している。これによりウイルスは相同組換えによる遺伝的多様性の獲得や、ゲノム損傷の補償を行っていると言われる。しかしそれらの理由が二量体化という複雑で手間のかかるイベントを、物理的制約を抱えるウイルスが捨てずにいることを十分説明できるとは考えにくい。本研究はHIV-1のゲノム二量体化は、複数のステップからなるゲノムパッケージングという機構のうちの必須な1ステップであるという可能性を示唆してきた。これは同時にin vitroでの実験系における結果のみでin vivoの反応を説明することの限界についての指摘でもあった。今回同定したHIV-1粒子内で働くゲノム二量体化領域の必要十分領域が、in vitroの系で指摘されていた部分をすべて内包しつつそれより遙かに広く複雑な領域であったことはこれまでと同様にin vivoでの解析の重要性と独自性を示すものである。

HIV-1の多様なサブタイプと、近年急速に複雑化の兆候をみせているサブタイプ間組換え体の出現は、遺伝的多様性の獲得

により繁栄するHIV-1にとってその勢力を伸ばす原動力の一つとなっていると考えられる。

組換え体生成機構の素反応の一つであるゲノムヘテロ二量体化機構の解析は、ウイルスの進化や抗ウイルス戦略を考える上で重要な知見を見いださう。

我々の系を用いることにより初めて可能となった粒子内でのサブタイプ間のゲノムヘテロ二量体化効率の比較により、サブタイプの組み合わせによって効率に大きな差があることや、従来の二量体化領域だけでは機能的に不十分なサブタイプが存在することが明らかとなった。これらのことは組換え体の生成しにくいサブタイプの組み合わせが存在することを示唆しており、興味深い。

E, 結論

HIV-1粒子内でのゲノム二量体化をパッケージングと切り離して解析する独自のシステムを構築し、ゲノムRNA上の二量体化シグナルの必要十分領域を同定することに成功した。さらにHIV-1サブタイプ間のヘテロゲノム二量体化の効率についても解析し、ヘテロ二量体化しやすいサブタイプの組み合わせがあること明らかとなった。

F, 研究発表

1, 論文発表

1) Jun-ichi Sakuragi, Shigeharu Ueda, Aikichi Iwamoto, and Tatsuo Shioda. Relationship between dimerization and packaging of HIV-1 genome RNA; a possible role of dimerization in genome packaging. JOURNAL OF VIROLOGY, Apr. 2003, Vol. 77, No. 7. 4060-4069.

2) 櫻木淳一 RNA を介した細胞の抗ウイルス戦略に関する最近のトピック RNA Network Newsletter 2003, Vol. 1, No. 2. 39-42.

2, 学会発表

1) Analysis of packaging and dimerization of HIV-1 genome RNA in virion. Jun-ichi Sakuragi and Tatsuo Shioda, 2003 International Retroviral Nucleocapsid Symposium, Strasbourg, France.

2) HIV-1 ゲノム二量体化に関する解析 櫻木淳一、塩田達雄、シンポジウム、第 51 回日本ウイルス学会学術集会、京都

3) Analysis of packaging and dimerization of HIV-1 genome RNA in virion. Jun-ichi Sakuragi and Tatsuo Shioda. RNA2003Kyoto, 京都

4) HIV-1 のゲノム二量体化及びパッケージングに関する解析 櫻木淳一 第 17 回日本エイズ学会学術集会、神戸

5) HIV-1 のパッケージング及びゲノム RNA 二量体化に関する解析 櫻木淳一、塩田達雄 第 26 回日本分子生物学会年会、神戸

G, 知的所有権の取得状況

なし

図 1

パッケージング能に影響を与えない、
in vivoでのゲノム二量体化解析システム

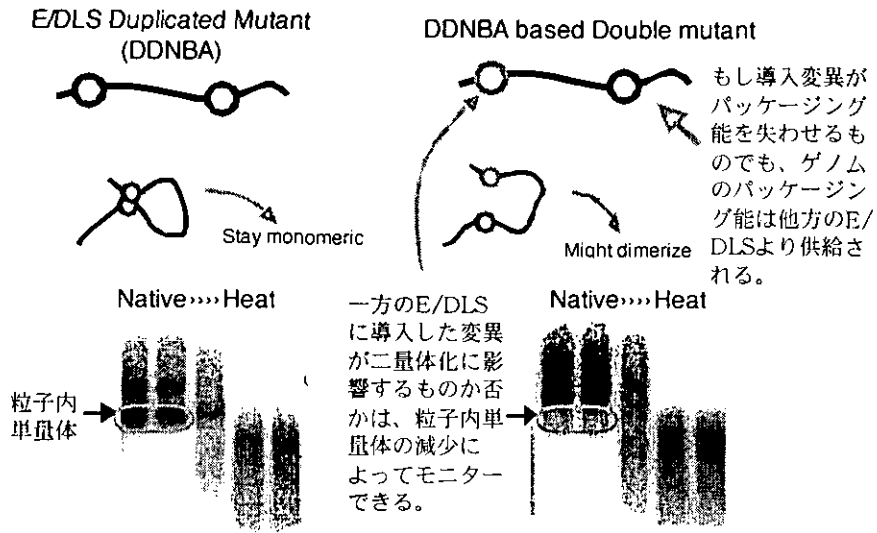
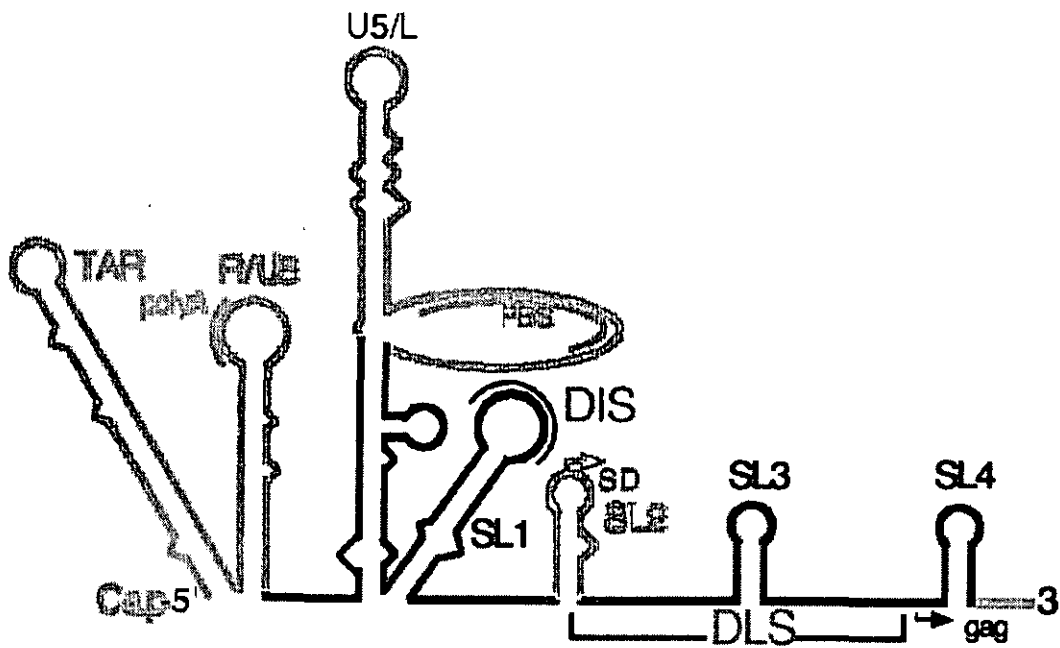
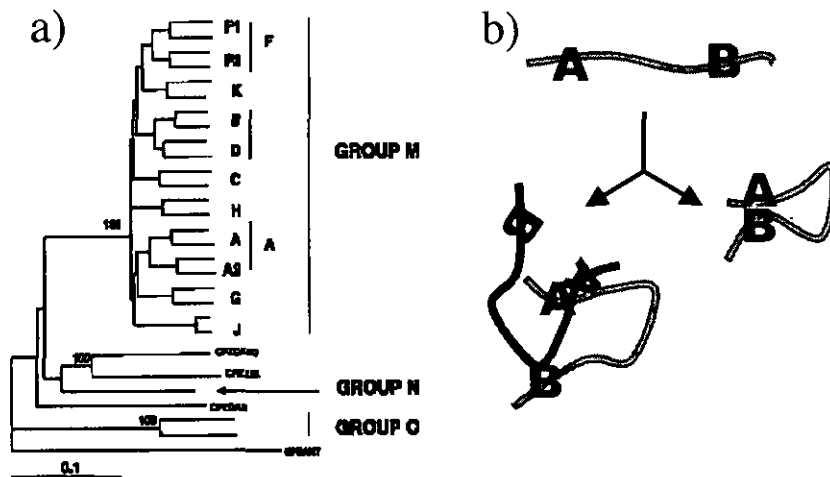


図 2 HIV-1 粒子内ゲノム二量体化に必要な十分と考えられる領域。

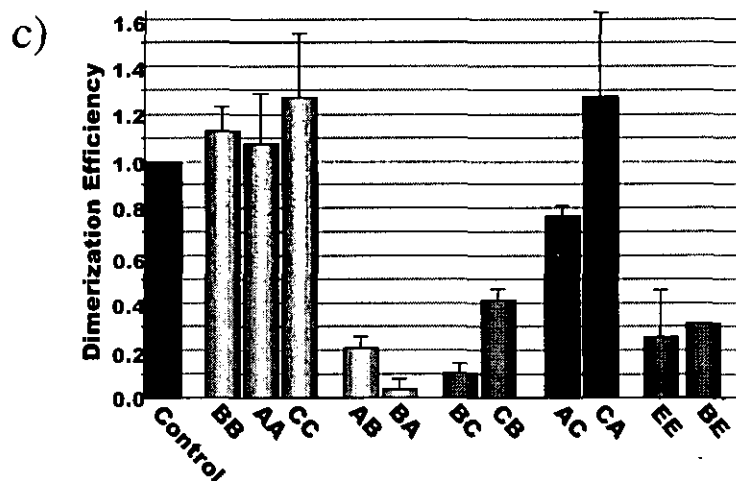


DIS, DLS は in vitro の実験系から示されている二量体化シグナル。

図3 HIV-1 サブタイプ間ヘテロゲノム二量体化に関する解析



<http://hiv-web.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/PEETERS2000Peeters.html>



- a) HIV-1 のサブタイプの遺伝的多様性を元にした系統樹
- b) 本実験系の概略図。たとえばウイルスゲノム上でサブタイプ A の DLS を 5'側に、B の DLS を 3'側に配置した変異体を作成する。A-B 間のヘテロ二量体化が効率よく起これば単量体が、効率が悪ければ二量体が粒子内に多く生成する。
- c) 実際の結果。サブタイプ A-C 間のヘテロ二量体のみがホモ二量体と同等の効率で生成することが確かめられた。サブタイプ E はホモ二量体化効率も悪かった。

21. HIV-1 感染性分子クローン樹立法の効率化について

分担研究者：巽 正志 (国立感染症研究所獣医科学部)

研究要旨 MAGIC-5A 細胞と Long PCR を用いた「HIV Trapping System」で現在までに世界に先駆けて Subtype C, A および AG 組換体の感染性 DNA クローンを報告してきたが、必ずしも効率的な系とはいいがたかった。HIV-1 genome の Vpr および Vif 領域に多くの HIV-1 で保存されている部位を Primer に用いて構築する Half and Half Strategy をとることにより効率化され、アフリカ Zambia 由来 subtype C 8 クローン、Ghana 由来 subtype A 6 クローン、AG Recombinants 7 クローンおよび世界に先駆けて subtype G 2 クローンの樹立に成功した。格段に効率化された本樹立法は HIV-1 研究の各方面への応用が可能と考えられる。

A. 研究目的

現在までの HIV 研究は主に欧米に流行している subtype B の Molecular clones を用いてその病原性を担う遺伝子領域が検索されてきた。しかしながら最近の HIV-1 の感染中心は欧米からアフリカ、東南および南アジア地域に移行しており、そこで主に異性間性交渉で流行している HIV-1 は subtype C, subtype A, CRF01_AE および CRF02_AG 組換体が多くを占めている。HIV-1 subtype B は異性間の感染も認められるが主に homosexual および麻薬静注者などの risk group に侵淫していることが知られている。一方、Subtype 間における感染経路による感染効率の違いが指摘されているにもかかわらず、subtype B 以外の感染性クローンが得られていないため、その違いに由来する HIV-1 subtype 間の遺伝子構成の相違に基づく病原性解析の進展における隘路になっている。本研究は subtype B 以外の発展途上国で流行している subtype の感染性クロー

ンの樹立を試み、将来のワクチン開発および subtype によるウイルスの病原性解析の分子基盤を整備することを目的とする。併せてより効率的な HIV 感染性クローン樹立実験系を確立し多様性に富む病原体である。HIV-1 複製と易変異性発現の分子過程の研究に資する多様な分子クローンを提供することにある。

B. 研究方法

HIV-1 ウイルスのクローニングおよび Long PCR と全長ゲノム Plasmid 構築は先に報告した HIV 感染価測定系 Indicator 細胞 MAGIC-5/HeLa4.5 nEGFP 細胞株を用いた HIV ウイルスクローニングと感染性クローンの構築系(HIV Trapping System ; HIV 捕捉実験系)により行った。対象としたウイルスは Zambia Lusaka で分離された subtype C15 検体 (山梨大、照沼博士から入手) および本年 8 月に Ghana Accra で採取し空輸された血液から分離した 18 検体 (国立感染症研究所佐多博士から入手) であ

る。まず Ghana25 検体を Donor PBMC あるいは MAGIC5A 細胞との Coculture でウイルス分離した。得られたウイルスを感染させた MAGIC-5A 細胞からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として、Long PCR を行い 5'-および 3'-側のプロウイルスゲノムを増幅、それらを連結することによって完全長の DNA クローンを得た。完全長 DNA クローン作製の戦略は当初先に報告した 5'-LTR から PBS までを予め pBR322 ベースの Cloning Vector pMT1 に組み込み、その Kas I 部位から 3'-LTR の PolyA signal 下流までを Not I 部位を付け加えた Primer で増幅した 9.0 Kbp に及ぶ Long Amplicon を制限酵素処理精製後組み込む方法と HIV Database から Vpr および Vif 領域における Rare cutter の制限酵素を選定し、その塩基配列を含む Primer で HIV-1 genome Vpr および Vif 下流領域を増幅し pMT1 に組み込み、しかる後に Vpr および Vif 上流領域を増幅した断片を酵素処理後組み込む Half & Half 戦略を用いて全長クローンを得た。得られたクローンは HeLa4.5nEGFP 細胞に Transfection しその培養上澄を MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。この Half & Half Strategy の効率を確認するため、NL4-3 株感染 MAGIC-5A ゲノムを鋳型に Vpr 領域の EcoR I site を用いた Primer で再構築した NL4-3 クローン感染性クローン樹立効率を確かめた。

C. 研究結果

まず Ghana25 検体からの樹立概要を述べる。本年 7 月 28 日から 29 日にかけて首都

Accra 近郊で採取した患者 EDTA 附加血液はおよそ 2 日間の空輸のうえ搬入され直ちにリンパ球分離の上 Donor PBMC あるいは MAGIC5A 細胞との Coculture でウイルス分離した。その分離効率は Donor PBMC との Coculture で 12/25、MAGIC-5A 細胞との Coculture で 16/25 であった。分離ウイルス株感染 MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に簡易 subtyping 法である gag 領域を標的とした Heteroduplex Mobility Analysis (HMA; Heyndrickx L et al. J.Viol. 74:363 - 370, 2000)によりその subtype を推測したところ、subtype A 7/18, AG Recombinant 6/18, subtype G 2/18, 判定不能 3/18 であった。分離ウイルス感染 MAGIC-5A 細胞ゲノムを鋳型に HIV genome 右半分を Nco I site を含む Vpr Forward Primer あるいは Cla I site を含む Vif Forward Primer と 3' LTR poly A signal 下流領域に Not I site を附加した Reverse Primer で約 4.5Kbp の Amplicon を増幅し電気泳動後精製し制限酵素処理後該当酵素で切断されないことを確認後 HIV-1 Cloning Vector pMT1 へ組み込み、LacZ 発現選択により組み込み陽性クローンを 5 クローン選別した。同じ Primer の Complementary な Reverse Primer と各 subtype consensus 5' LTR 領域上流に Sal I site を附加した Forward Primer で HIV genome 左半分を増幅後精製し該当酵素にて処理後精製し、酵素処理した先の右半分を組み込んだクローンに組み込み全長クローンを得た。得られたクローンは HeLa4.5nEGFP 細胞に Transfection しその Tat 活性と Syncytium

形成を確認後、その培養上澄を MAGIC-5A 細胞にかけ感染性を確認した。分離ウイルスにより異なるがそれぞれ 32 から 40 クロオンを分離し、その感染性を検討した。多くのウイルス株では 60% 以上のクロオンが Syncytium 陽性であるが、さらに感染性を示すクロオンは限られることが判明した。総計 52 クロオンが分離されたが、subtype A は 4 検体から 6 クロオン、AG recombinant は 5 検体から 7 クロオンおよび subtype G は 1 検体から 2 クロオンの感染性クロオンを選定し、現在全長塩基配列を決定の途上であるが、得られた配列ではそれぞれの clone は HMA で推測された subtype であることが確認された。対照比較として構築した NL4-3 株の Syncytium 形成率は 65%、感染性陽性クロオン樹立率は 4/40 即ち 10% となった。現時点で Ghana 検体のクロオン樹立率は 5% 内外である。現在得られたクロオンの全長塩基配列を決定の途上である。

また Subsahara の Zambia Lusaka で一昨年从去年にかけて分離された subtype C ウイルスについても同様の戦略を用いて感染性クロオンの樹立を試みたところ 7 検体から 14 クロオンの感染性クロオンが得られ、既に 5 クロオンが全塩基配列解析が終了し、全長を対象とした系統樹解析でアフリカ型 subtype C に Cluster を形成することが判明した。

D. 考察

本年度は、Half & Half Strategy により「HIV trapping System」のさらなる効率

化を実現し多くの non-B subtype 感染性クロオンを樹立し、塩基配列決定の途上ではあるが subtype G の感染性クロオンを世界に先駆けての樹立に成功した。このクロオンと同一時期地域で流行している subtype A および AG Recombinant クロオンを樹立できたことは組換え体生成の機序を解析する重要なクロオンを取得したことを意味し、今後の意義ある課題になりうるものと考えられる。

また今回比較対照とした NL4-3 株の検討から現時点の Long PCR 法による HIV genome の増幅における合成酵素の fidelity では感染性クロオンの取得率はほぼ極限までできていることが推測された。しかしながら今後も PCR DNA Polymerase の Fidelity の向上は期待できることから、この戦略がさらに有効になるものと考えられる、

今回の成果により本研究班で開発途上国に浸透している主要な Subtype 全てについて複数の感染性クロオンを樹立することが出来た。特にアフリカ型 Subtype C は現在 Essex M らが報告した異なる患者由来の Chimera genome クロオンしかないことから、同じ Subsahara の Zambia からの複数のクロオンが得られたことは喫緊に求められているワクチン開発にとって実態に即した分子基盤を提供できるものとする。

当初の本研究班の目的である開発途上国に流行する主要な subtype 全ての感染性クロオンがえられたことは subtype 間のウイルス学的生物学的性状の差異をその遺伝子構造から解析比較できるのみならず、それぞれの subtype に対するワクチン開発の分子基盤が

整備されたことを意味する。今年度に達成されたクローン樹立率の向上は更に改善され得ると考えられるが実用化の段階に達したと考えられる。多様な遺伝子構造を持つ HIV-1 の研究はさらに多くの感染性クローンを必要とするが、その取り掛かる基盤が整備された。

E. 結論

感染性クローン樹立法をより効率的に進化させ複数の non-B subtype の感染性クローンを樹立した。

F. 謝辞

本報告書の Zambia 由来ウイルスに関しては山梨大学 照沼博士、東京医科歯科大学 市村博士、国立感染症研究所エイズ研究センター 原、本多および山本各博士との共同研究であり、Ghana 由来ウイルスに関しては国立感染症研究所感染病理部 徳永、佐多博士および Ghana 野口記念医学研究所との共同研究である。

G. 研究発表

(1) 発表論文

Hachiya A., Matsuoka-Aizawa S., Tsuchiya K., Gatanaga H., Kimura S., Tatsumi M. and Oka S. "All-in-One Assay", a direct phenotypic anti-human immunodeficiency virus type 1 drug resistance assay for three-drug combination therapies that takes into consideration in vivo drug concentrations. J Virol Methods. 2003, 111:43-53.

Takebe Y., Motomura K., Tatsumi M., Lwin H.H., Zaw M. and Kusagawa S. High prevalence of diverse forms of HIV-1 intersubtype recombinants in Central Myanmar: geographical hot spot of extensive recombination. AIDS. 2003, 17:2077-87.

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

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

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・主任研究官

研究要旨：日本に蔓延している HIV に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本の HIV について集団としての進化の動向を明らかにする。

今年度は、日本の HIV 集団のうち母子垂直感染 HIV 集団について V3 部の分子力学的構造解析を行った。また、昨年度までに開発した蛋白構造系統樹解析法により HIV の V3 部構造と中和能の関連を検討した。以上の検討により以下の知見を得た。

- ① 母子感染が成立した 5 ペアにおいて、母から児に感染しなかった HIV クローンと感染が成立した HIV クローンでは、その V3 部分子力学的構造に大きな差はなかった。この事は児に移行しやすい V3 部構造の存在が否定的であることを示しており、母子感染は V3 部構造に依存しない可能性が示唆された。
- ② HIV の V3 部構造は中和能と関連することが示唆された。

協力研究者

原敬志 国立感染症研究所・エイズ研究センター
吉野直人 同
滝澤万理 同

A. 研究目的

日本に蔓延している HIV に適したワクチン開発への基礎データ蓄積を最終目的とし、日本の HIV について集団としての進化の動向を明らかにする。

今年度は、日本の HIV 集団のうち母子垂直感染 HIV 集団について V3 部の分子力学的構造解析を行った。また、昨年度までに開発した蛋白構造系統樹解析法により HIV の V3 部構造と中和能の関連を検討した。

B. 研究方法

(1) 日本の母子垂直感染 HIV 集団についての V3 部分子力学的構造解析

1984 年から 2002 年までに母子感染例は 30 例確認されており、このうち母児ともに多クローン解析がなされている 5 ペアを対象とした。全てのクローンについて V3 部の蛋白構造は既報通りに PDB 化した。すなわち、統合計算化学システム MOE (蛋白構造解析ソフト: molecular operating environment) を用い、PDB に登録されている V3 部 3 次元構造をテンプレートに、対象の V3 アミノ酸配列からその 3 次元構造を計算し構築した。さらにテンプレートに対する RMSD 値を算出し、相同性の指標とした。

(2) HIV の V3 部構造と中和能の関連
中和抗体 KD247 による中和能が判明して

いる10株の HIV (臨床ウイルス5株を含む) について前記同様に V3 部構造をモデル構築。それらの構造について昨年度開発した蛋白構造系統樹解析ソフト (ProCluster) を用いて系統樹解析を行った。

C. 研究結果

(1) 日本の母子垂直感染 HIV 集団についての V3 部分子力学的構造解析

母から児に感染しなかった HIV クローン (non transmitter) と感染が成立した HIV クローン (transmitter) では、テンプレート V3 に対する RMSD 値分布に有意な差は見られなかった。(図1)

(2) HIV の V3 部構造と中和能の関連

KD247 により中和される株と中和されない株はクラスタリングされた。但し、中和されない5株のうち1株が中和される群にクラスタリングされた。(図2)

D. 考察

HIV 母子感染は感染元と感染先が事前に判明しているため、感染機序を解明するには絶好の標的であり、実際に解析も進んでいる。ウイルス側の要因として CCR5 好性ウイルスが主体となって移行することが知られており、その事は遺伝子学的系統樹解析においても裏付けられている。昨年度、CCR5 好性ウイルスと CXCR4 好性ウイルスは少なくとも我々の手法では構造学的に分類困難であることを報告した。今年度は、遺伝子学的にも生物学的にも CCR5 好性ウイルスが主体であると言われている HIV 母子感染において、構造学的にもそれを支持するデータが得られるかどうか検討した。

図1に示したように、transmitter は non transmitter と構造学的に区別できないことが示唆された。さらに、データは示していないが、蛋白系統樹解析によっても両者は明確には分類されない。以上より CCR5 好性という

HIV の特性はアミノ酸の構造ではなくあくまでもその配列に依存している可能性が強いと考えられる。

図2に示したように、HIV の生物学的特性である中和能は V3 部構造と関連する可能性はあるものの、同じデータで構造非依存性のウイルスの存在も示唆している。

今回の2つの結果を併せると、HIV の生物学的特性は、構造に依存する部分は少なく、あくまでもアミノ酸配列依存性が優位であることが考えられる。

しかしながら今回用いた分子力学的構造解析の手法は緒についたばかりで、前記の結論を確定するには、精度の検証・対象の選定・解析数の蓄積等、さらなる検討が必要である。

E. 結論

① 母子感染が成立した5ペアにおいて、母から児に感染しなかった HIV クローンと感染が成立した HIV クローンでは、その V3 部分子力学的構造に大きな差違はなかった。この事は児に移行しやすい V3 部構造の存在が否定的であることを示しており、母子感染は V3 部構造に依存しない可能性が示唆された。

② HIV の V3 部構造は中和能と関連することが示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kaizu M, Ami Y, Nakasone T, Sasaki Y, Izumi Y, Sato H, Takahashi E, Sakai K, Shinohara K, Nakanishi K, Honda M. Higher levels of IL-18 circulate during primary infection of monkeys with a pathogenic SHIV than with a nonpathogenic SHIV. *Virology*. 2003 Aug 15;313(1):8-12.

2) Kaizu, M., Ami, Y., Izumi, Y., Sato, H.,

Takebe, Y., Nakasone, T., Someya, K., Kitamura, K., Tochikubo, O., and Honda, M. 2003. Infection of macaques with an R5-tropic SHIV bearing a chimeric envelop carrying subtype E V3 loop among subtype B framework. Arch Virol Apr;148(5):973-988.

3) Nakao R, Hanada N, Asano T, Hara T, Salam Md A, Matin K, Shimazu Y, Nakasone T, Horibata S, Aoba T, Honda M, Amagasa T, Senpuku H. Assessment of oral transmission using cell-free HIV-1 in mice reconstituted with human peripheral blood leucocytes. Immunology. 2003 Jun;109(2):271-282.

4) 富田康浩、横山勝、仲宗根正、永井美之、佐藤裕徳. 2003. SIV gp120 コアの機能領域に付加する糖鎖の役割. 日本エイズ学会誌、5:89-91.

5) 仲宗根正、原敬志、染谷健二、池尾一穂、五條堀孝、山本直樹、本多三男. 2003. HIV 感染症統合データベースの開発. 日本エイズ学会誌、(in press)

2. 学会発表

1) Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. International Symposium on "Research and Development of Recombinant BCG and Vaccinia Virus-Based HIV Vaccine" (Feb 5-6, 2003, Tokyo)

2) Nakasone T, Yamamoto N, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Yamazaki S, Honda M.

Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. 10th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Feb 10-14, 2003, Boston, USA)

3) Nakasone T, Izumi Y, Matsuo K, Ami Y, Someya K, Kanekiyo M, Hamano T, Horibata S, Yoshino N, Hara T, Takizawa M, Kawahara M, Kaizu M, Hamatake M, Sakai K, Shinohara K, Yamazaki S, Yamamoto N, Honda M. Prime-boost vaccination with recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin and vaccinia strain DIs elicits protective immunity against pathogenic SHIV infection in macaques. Japan-U.S. Cooperative Medical Science Program 14th Joint Meeting of AIDS Panel (March 5-7, 2003, Okinawa)

4) Ibuki K, Enose Y, Miyake A, Suzuki H, Takahashi M, Horiuchi R, Saito N, Nakasone T, Ami Y, Izumi Y, Honda M, Takahashi H, Miura T, Hayami M. Analysis of viral expansion and immune reaction at early phase of acute pathogenic SHIV intrarectal infection in macaques. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA)

5) Suzuki H, Suzuki M, Ibuki K, Masuda K, Minato N, Kawamoto H, Nakasone T, Honda M, Hayami M, Miura T. The effects of pathogenic SHIV infection on the thymus and intrathymic T cell progenitor in rhesus monkeys. 21th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS (Oct. 22-25, 2003, Seattle, USA)

6) 仲宗根正、染谷健二、原敬志、池尾一穂、五條堀孝、本多三男 HIV 感染症統合データ

ベースの開発 2003 年情報学シンポジウム
(1/16-17, 2003, 東京)

7) 伊吹謙太郎、榎瀬良美、三宅在子、鈴木元、
高橋めぐみ、堀内励生、齊藤尚紀、仲宗根正、
本多三男、高橋秀美、速水正憲、三浦智行 強
毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜
免疫細胞の動態 第 136 回日本獣医学会
(10/3-5, 2003, 青森)

8) 鈴木元、鈴木麻貴子、三宅在子、伊吹謙太
郎、増田恭子、伊川友活、河本宏、仲宗根正、
本多三男、速水正憲、三浦智行 強毒サル/
ヒト免疫不全キメラウイルス感染初期におけ
る胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析 第
136 回日本獣医学会 (10/3-5, 2003, 青森)

9) 伊吹謙太郎、榎瀬良美、三宅在子、鈴木元、
高橋めぐみ、堀内励生、齊藤尚紀、仲宗根正、
本多三男、高橋秀美、速水正憲、三浦智行 強

毒 SHIV の経直腸感染初期における腸管粘膜
免疫細胞の動態 第 51 回日本ウイルス学会
(10/27-29, 2003, 京都)

10) 鈴木元、鈴木麻貴子、三宅在子、伊吹謙
太郎、増田恭子、伊川友活、河本宏、仲宗根
正、本多三男、速水正憲、三浦智行 強毒サ
ル/ヒト免疫不全キメラウイルス感染初期に
おける胸腺組織及び胸腺内 T 前駆細胞の解析
第 51 回日本ウイルス学会 (10/27-29, 2003,
京都)

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図 1。母子感染移行ウイルス(transmitter)と非移行ウイルス(non transmitter)の構造学的相違

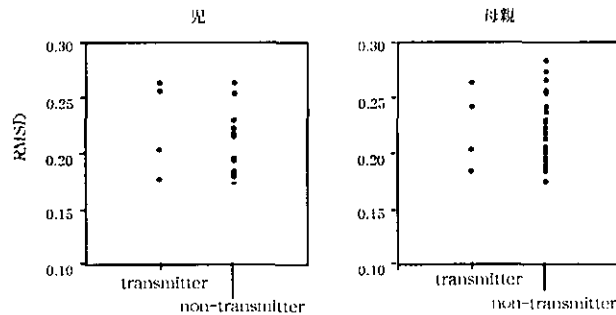


図 2。MOEを用いたV3部蛋白分子力学的系統樹

