

ウイルスを各種細胞株に感染後、感染細胞抽出液中ルシフェラーゼ活性を測定することにより single round 感染系におけるウイルスの感染価を求めた。

(倫理面での配慮)

該当事項なし。

C. 研究結果

(1) ウイルス増殖カイネティクス

T細胞株における 20LK 変異によるウイルス増殖阻害は、ウイルス産生細胞(T細胞株における 20LK 変異によるウイルス増殖阻害は、産生細胞またはHeLa)に関わらずその阻害が大きいもの(H9, Molt-4)、中程度のもの(CEM(12D-7))、小さいもの(Jurkat, MT-4)に分かれた。20LK/73EK/82AT 復帰変異の復帰の程度も細胞株によって異なっていた。すなわち、H9 では 20LK 変異による増殖欠損をほぼ完全に回復したが、Molt-4 では部分的に回復し、CEM(12-7)細胞では全く回復しなかった。(図1、図2)。活性化 PBMC における 20LK 変異によるウイルス増殖阻害は、ウイルス産生細胞によって異なるパターンを示した。293T から産生された 20LK の増殖阻害はわずかだったが、HeLa から産生された 20LK の増殖阻害は顕著であった。また、20LK/73EK/82AT 復帰変異の復帰の程度は部分的であった(データ省略)。

(2) Single round 感染系：

まず、20LK 変異によるウイルス増殖阻害を NL4-3Env でシュードタイプしたウイルスを用いて Single round 感染系で評価した。

20LK 変異による感染価は、H9, CEM(12D-7), Molt-4 で野生株の約 20%、MT-4 で約 70%とほぼ増殖カイネティクスの結果を反映していた(データ省略)。20LK/73EK/82AT 復帰変異の細胞依存性も同様で、H9 では 20LK 変異による増殖欠損をほぼ完全に回復したが、Molt-4 では部分的に回復し、CEM(12-7)細胞では全く回復しなかった。(図3)。

(3) ウイルス侵入後に欠損を有する MA 変異株の探索

HIV-1 Env、Ampho-tropic MuLv Env、VSV-G の3つのエンベロープタンパクでシュードタイプしたウイルスの Single round 感染における感染価を比較することにより、以下の3つの MA 変異株がウイルス侵入後に欠損を有するか否かを検討した。

6VR:20LK とは反対に Gag タンパクの膜結合性を減少させ、ウイルス放出量が野生株の約 30%に減少する。

49LD:ウイルス放出量がやや減少(約 80%)する意外にアセンブリー過程に明らかな欠損はない。

86CS:ウイルスの targeting が細胞質膜から細胞質へと変化しウイルス放出量が野生株の約 40%に減少する。

6VR は NL4-3Env でシュードタイプしたウイルスで野生株の約 10%の感染価を示し、その欠損は Ampho-tropic MuLv Env、VSV-G のいずれのエンベロープタンパクでシュードタイプしても回復しなかった。これに対して、49LD, 86CS は NL4-3Env でシュードタイプしたウイルスで野生株の約

数%の感染価を示し、その欠損は Amphotropic MuLV Env では回復しなかったが、VSV-G のエンベロープタンパクでシュードタイプすることによってほぼ野生株並みに回復した (図4)。

D. 考察

これらの結果は、20LK 変異や 20LK/73EK/82AT 復帰変異によって MA タンパクとの相互作用が変化する宿主因子 (その中にはウイルス侵入後の脱殻・逆転写過程に関与するものが含まれると予想される) の発現レベルが細胞種によって異なっていることを示唆している。現在、阻害の程度の差がウイルスの侵入後から核移行に至るどの段階で生じているのかを検討中である。また、今回新たに見出したウイルス侵入後に欠損をもつ3つの MA 変異株の中2つは 20LK 変異とは異なる (おそらく少し前の) ウイルス侵入過程に欠損があると予想され、宿主因子探索の材料としても有用であると期待される。

E. 結論

逆転写の効率と合成された DNA の安定性を低下させる MA の変異 (20LK) による増殖阻害の程度とその復帰変異 (20LK/73EK/82AT) の可否には細胞依存性があることが明らかになり、MA 変異、復帰変異によってウイルスタンパクとの相互作用が変化する宿主因子の発現レベルに細胞依存性があることを示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1. Murakami, T., A. Yoshida, S. Kumakura, R. Tanaka, S. Mitsunashi, K. Hirose, M. Yanaka, N. Yamamoto, and Y. Tanaka. 2004. KRH-2731•5HCl, an orally bioavailable HIV-1 entry inhibitor is a CXCR4 antagonist. *Retroviruses*, Cold Spring Harbor, N.Y., USA. May 25-30.

2. Murakami, T., A. Yoshida, S. Kumakura, R. Tanaka, S. Mitsunashi, K. Hirose, M. Yanaka, N. Yamamoto, and Y. Tanaka. 2004. KRH-2731-5HCl: A new potent and orally bioavailable X4 HIV-1 inhibiting CXCR4 antagonist in vivo. XV International AIDS Conference. Bangkok, Thailand, July 11-16.

3. Murakami, T., A. Yoshida, S. Kumakura, R. Tanaka, S. Mitsunashi, K. Hirose, M. Yanaka, N. Yamamoto, and Y. Tanaka. 2004. KRH-2731•5HCl: An orally bioavailable CXCR4 antagonist is a potent X4 HIV-1 inhibitor in vivo. Fifth AIDS Seminar in Kumamoto, Kumamoto City, Japan, Sep. 9-10.

4. 村上努, 田中礼子, 山本直樹, 田中勇悦. KRH-2731•5HCl: 新規 CXCR4 アンタゴニストは経口利用可能な HIV-1 侵入阻害剤である 第52回日本ウイルス学会学術集会・

総会, 横浜, 2004年11月21-23日

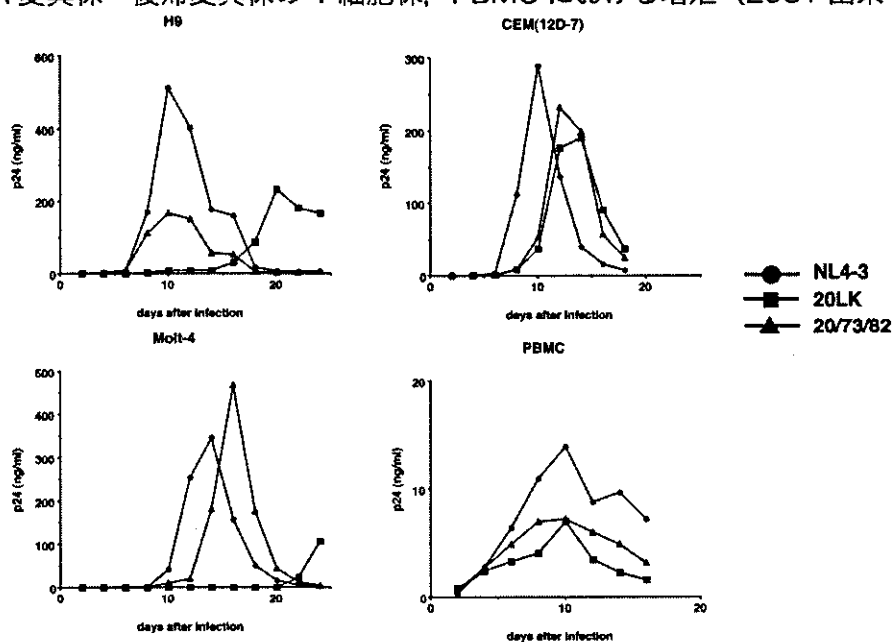
の復帰変異株の細胞特異性 第27回日本
分子生物学会年会, 神戸, 2004年12月8-11
日

5. 吉田篤司, 村上努, 田中礼子, 田中勇
悦. HIV-1によるヒト単球の樹状細胞への分
化阻害 第18回日本エイズ学会学術集
会・総会, 静岡, 2004年12月9-11日

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当事項なし

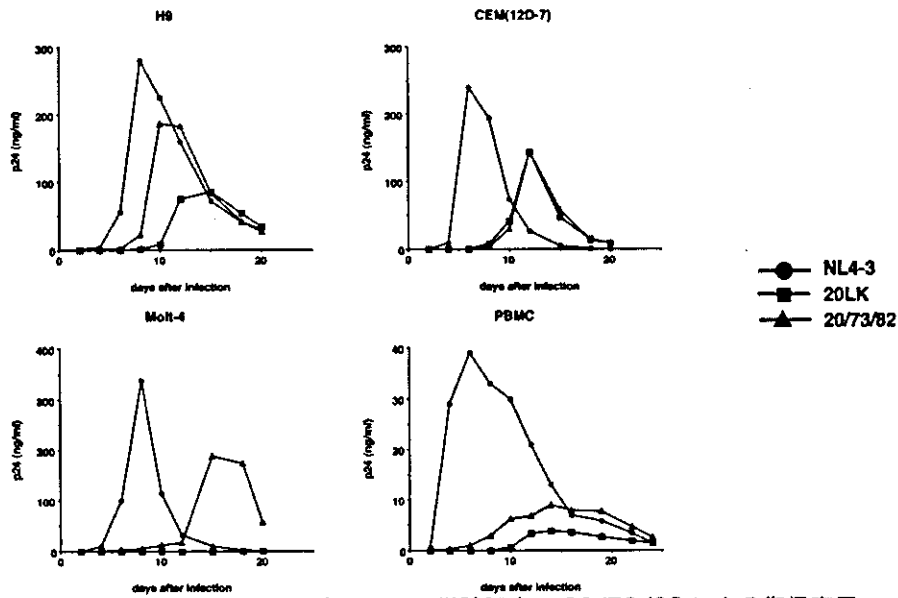
6. 村上努, E. O. Freed, 山本直樹, 田中勇
悦. HIV-1侵入直後に欠損をもつ変異株とそ

図1. MA変異株・復帰変異株のT細胞株, PBMCにおける増殖(293T由来ウイルス)



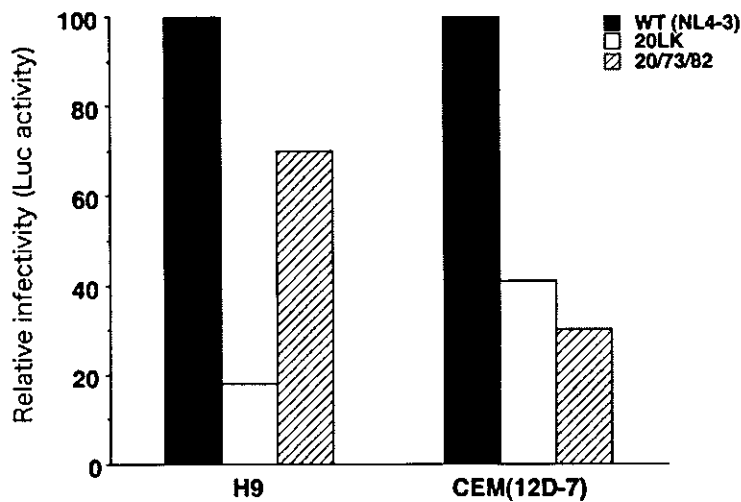
1. H9, Molt-4では20LKによるウイルスの増殖阻害+20/73/82による復帰変異
2. CEM(12D-7)では20LKによるウイルスの増殖阻害+20/73/82では復帰せず
3. PBMCでは20LKによるウイルスの増殖阻害がきわめて弱い

図2. MA 変異株・復帰変異株の T 細胞株, PBMC における増殖 (HeLa 由来ウイルス)



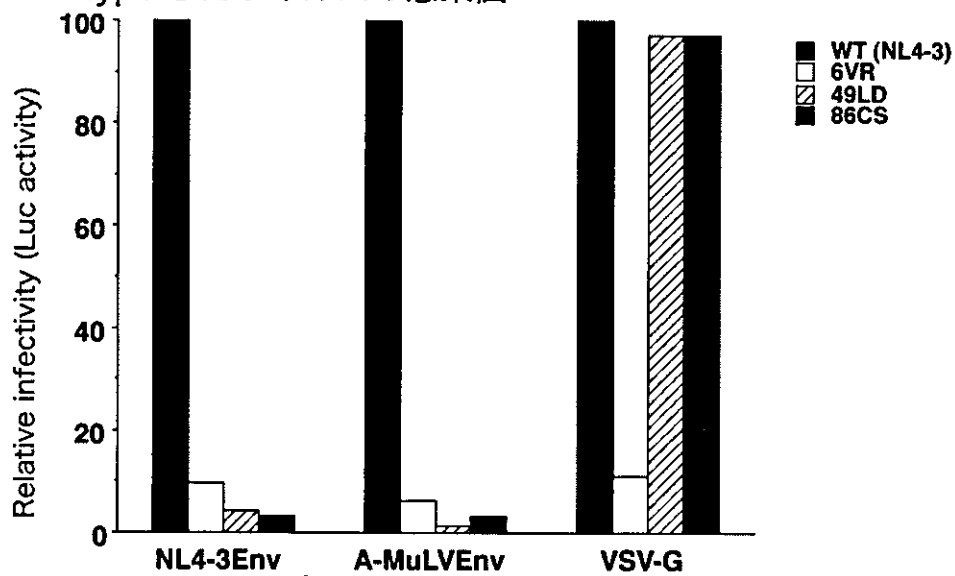
1. H9 では 20LK によるウイルスの増殖阻害 + 20/73/82 による復帰変異
2. CEM(12D-7) では 20LK によるウイルスの増殖阻害 + 20/73/82 では復帰せず
3. Molt-4, PBMC では 20LK によるウイルスの増殖阻害 + 20/73/82 で部分復帰

図3. 20LK 変異, 20LK/73EK/82AT 復帰変異株 (293T 由来ウイルス) のシングルサイクル感染系における感染価 (H9 と CEM(12D-7) の比較)



Replication kinetics のデータと同様に 20LK/73EK/82AT は H9 では復帰変異として機能したが, CEM(12D-7) では復帰しなかった.

図 4. 各種 MA 変異株を HIV-1Env, Amphi-MuLVEnv, VSV-G で pseudotype したウイルスの感染価



Env タンパクを pseudotype したウイルスの感染価から、6VR は逆転写過程や合成ウイルス DNA の安定性に、49LD、86CS はウイルスと細胞の融合から逆転写に至る過程のどこかに欠損があると推定された。

4. HIV ゲノム二量体化制御：調節因子探索

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 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詳細な解析に取り組んだ。その結果以下のことが現在までに明らかになった。

1, HIV 粒子内で実際に働く二量体化シグナルの必要十分領域は約 150 塩基であり、ポリアデニル化シグナル・プライマー結合領域・スプライシングドナー等の機能領域は不要であった。

2, HIV の様々なサブタイプ間のゲノムヘテロ二量体化効率性は組み合わせによって様々であり、必ずしもサブタイプ間の遺伝的距離に依存していなかった。

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。一方、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。本研究では分担研究者が独自に構築した、粒子内 HIV-1 ゲノム二量体化をパッケージングと独立した形でとら

え、解析することのできる実験系を用いて実際の DLS の必要十分領域の探索、およびサブタイプ間ゲノムヘテロ二量体化の解析を行った。

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約 500 塩基分の 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'側あるいは 3'側の E/DLS に様々な変異を導入した一連の変異体を作成した。HIV-1 各サブタイプの感染性 DNA クローンもしくは分離株の分与を受け、クローン DNA やウイルス感染細胞 DNA より PCR にて各サブタイプの E/DLS をクローニングし、pNL43 とのキメラを作成した。

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S 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。

5, 感染実験

外被蛋白を持ったウイルスを抗原量を合わせて MAGIC5, MT-4 細胞に感染させた。MAGIC5 細胞は感染後 4 8 時間で固定し、 β -GAL 発色によりウイルスの感染価を測定した。MT-4 細胞は持続感染実験とウイルス逆転写産物定量実験とに用いた。持続感染実験では 3-4 日おきに細胞の上清収集と培地交換を行い、1 ヶ月程度のサンプリングの後、上清中の RT を測定、ウイルスの増殖曲線を求めた。ウイルス逆転写産物定量実験では感染後 1 6 時間に細胞を回収、染色体外 DNA を分離精製した後 Taqman 法に基づいてウイルス逆転写の各ステップの産物を定量した。

C, 研究結果

1, HIV-1RNA5' 領域の粒子内ゲノ

ム二量体化十分領域の探索

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 より産生された粒子内のゲノムの二量体化度合いを野性株と比較した。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。このことから、DDNBA の片方の E/DLS に変異導入を行い、粒子内単量体形成の度合いを調べることで二量体化機能領域のマッピングが可能となると考えられた。今回は DDNBA を母体に 3' 側の E/DLS の 5' 末および 3' 末から削除することで二量体化の十分領域を決定した。その結果 3' 末端はステムループ R/U5 と U5/L の境界領域を含み、5' 末端は Gag の ATG コドンを含む SL4 までの領域が十分領域として特定された。

2, HIV-1RNA 粒子内ゲノム二量体化必要十分領域の検索

上記で決定された十分領域を元に、さらに詳細な変異導入により必要十分領域の決定を試みた。昨年度までの研究によって明らかとなった部分的な二量体化機能領域のマップを元に、まずステムループ U5/L 領域の上部ステムループ及びプライマー結合領域を十分領域より削除した結果、予想通り二量体化能は保持されてい

た。さらに十分領域に存在する 4 つのステムループ SL1-4 をそれぞれ削除した変異体を作成し検討すると、スプライドナーとして機能している SL2 のみが二量体化領域として機能していないことが明らかとなった。ここまでで決定した HIV-1 のゲノム二量体化必要十分領域 (Lp4delta2) はわずか 145 塩基であり、ウイルスゲノム 5' 末端に存在するポリ A 付加シグナル、プライマー結合領域、スプライドナーといった機能領域はすべて不要であった (図 1)。Lp4delta2 領域をゲノム上に 2 カ所含む変異体 sTNLp4delta2 を作成して粒子内ゲノムを解析したところほぼすべてが単量体化しており、Lp4delta2 領域が実際に粒子内でゲノム二量体化の必要十分因子として働きうる事が確かめられた。

3, ウイルス感染における Lp4delta2 領域の働き

HIV-1 のゲノムは長さや配列の制限が比較的緩く、非必須遺伝子領域に GFP、PLAP 等のマーカー遺伝子を挿入した変異体は特に効率低下も復帰変異も起こさないまま自律的に増殖しうる事が知られている。今回同定された Lp4delta2 領域はこれらのマーカー遺伝子よりずっと短く、ウイルスの増殖に影響を与えうる機能領域もすべて欠如している。このことから、Lp4delta2 領域を HIV ゲノム上の非必須遺伝子領域内に挿入してもゲノムの二量体化能以外に影響を与えることは考えにくく、結果として自律的に複製する単量

体化ゲノムを持ったウイルスを作成できると考え、この領域を vpr もしくは nef 領域に挿入した DDEE+, DDXE+を作成した。これをヒトT細胞由来の MT-4 細胞に感染させると、野生株よりもかなり遅れて増殖が確認された。増殖してきたウイルスの粒子よりゲノム RNA を精製・解析したところすべて野生株と同様に二量体化しており、ゲノム塩基配列を解析したところいずれの変異体も挿入断片を欠落する復帰変異が起こっていた。

4. HIV-1 サブタイプ間ヘテロゲノム二量体化効率の測定

現在 HIV-1 のサブタイプは 10 種類以上報告されており、それらの組み換え体のうち流行している株 (Circulating Recombinant form: CRF) だけでも十数種類に及ぶ。HIV ゲノムの易変異性はウイルス病原性や進化に深く関与しており、ゲノムの二量体形成と逆転写時の相同組み換えはその一端を担っていると考えられ、CRF の存在はこれを裏付けている。我々の実験系は本来観察することが非常に困難な、異なる株間のヘテロゲノム二量体化を単純化して捉えることが可能であり、ウイルスの変異や進化を理解する上で重要な知見を得られると期待された。サブタイプ A (CRF A/G), B, C 間のゲノムヘテロ二量体化の程度を比較したところ、A-C 間の反応はホモ二量体化 (A-A, B-B, C-C) と同等の効率を示したのに対し、A-B, B-C 間のそれは明らかに低下していた。

D. 考察

これまでに研究分担者は、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。今回はこれまで構築してきた独自の解析系を利用してHIV-1の粒子内ゲノム二量体化のシス因子 (RNA) の必要十分領域を同定した結果、わずか150塩基であり、領域近傍及び内部に存在する他機能領域はすべて二量体化には不要であることも明らかとなった。このことは、HIV-1ゲノムの5'末端に重なるように存在してウイルス複製に働いている様々な機能領域は、すべてパッケージングやゲノム二量体化から独立しており、それぞれに高度に専門化した構造・機能を持って働いていることを強く示唆している。

同定された必要十分領域をゲノム上に複数配置することで、単量体ゲノムを持って自律複製するウイルスを作成する試みは成功しなかった。わずか150塩基の挿入によってウイルスの感染価が劇的に低下し、挿入部位を欠落しない限り複製能を回復できなかったことは、HIVにとって二量体化シグナルあるいはゲノム二量体化がパッケージング以外にも重要な役割を果たしている可能性を示唆している。またサブタイプヘテロゲノム二量体の結果からは、サブタイプの組み合わせによって二量体形成の効率に差があることが示唆された。サブタイプ A、B、C 間の遺伝

的距離はほぼ等しいことから、ヘテロ二量体化効率が遺伝的類似性に必ずしも従っていないことが明らかとなった。

E, 結論

以下のことが現在までに明らかになった。

1, HIV 粒子内で実際に働く二量体化シグナルの必要十分領域は約 150 塩基であり、ポリアデニル化シグナル・プライマー結合領域・スプライシングドナー等の機能領域は不要であった。

2, HIV の様々なサブタイプ間のゲノムヘテロ二量体化効率は組み合わせによって様々であり、必ずしもサブタイプ間の遺伝的距離に依存していなかった。

F, 研究発表

1, 論文発表

なし

2, 学会発表

1) HIV のゲノム二量体化に関する解析
櫻木淳一、第 3 回感染症若手研究者沖縄フォーラム、沖縄

2) HIV-1 ゲノム二量体化に関する解析
櫻木淳一・塩田達雄 第 52 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

3) 霊長類レンチウイルス粒子内ゲノム二量体化機構の解析 櫻木淳一 平成16年度杉浦奨励賞受賞講演、第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

4) HIV-1 ゲノム RNA 二量体化及びパッケージングに関する解析 櫻木淳一・塩田達雄 第 27 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

HIV-1 粒子内ゲノム二量体化必要十分領域

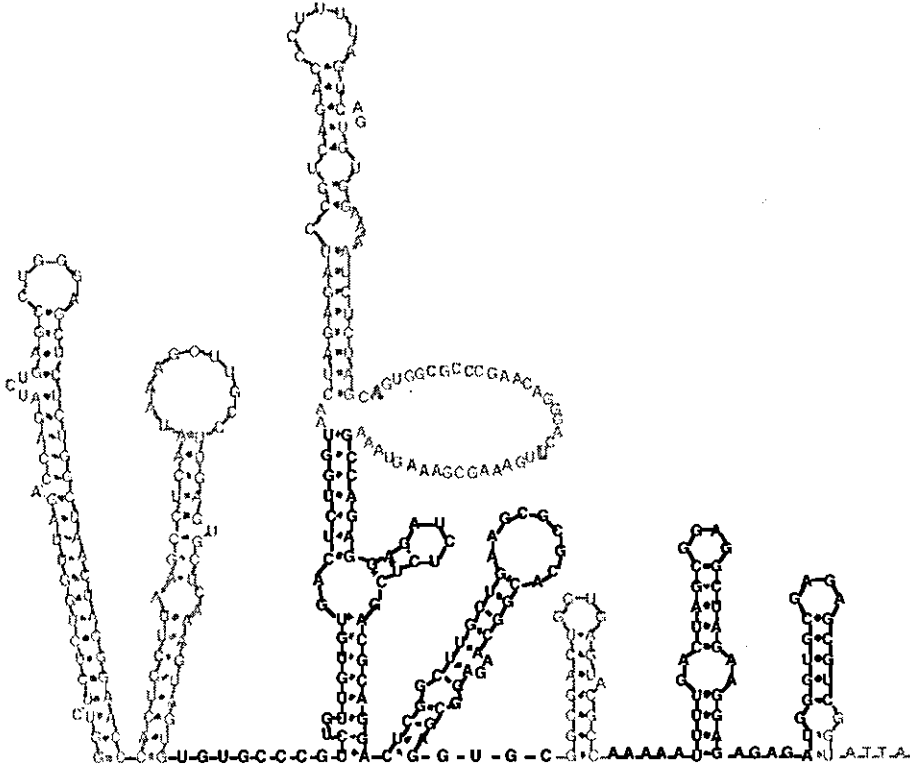
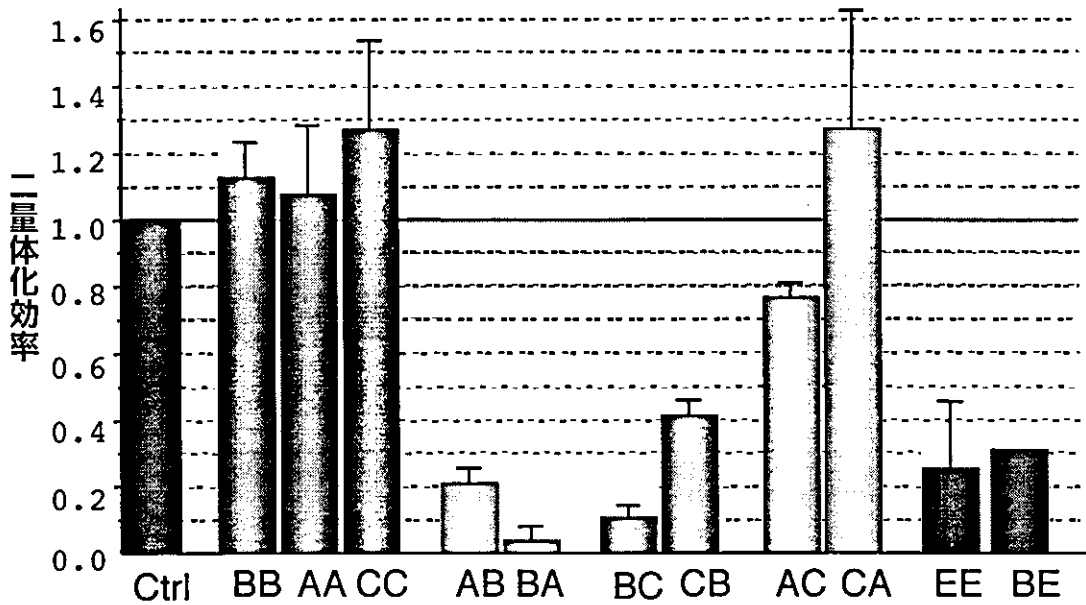


図2

HIV-1 サブタイプ間ヘテロゲノム二量体化効率の比較。サブタイプ A,B,C 間では、サブタイプ A-C の組合せのみが効率よくヘテロ二量体を形成しうる。



5. HIV-1 ゲノム安定性制御：調節因子探索

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 HIV-1 は AU に富むゲノム RNA を有している。活性化 T 細胞で発現が亢進する tristetraprolin (TTP) はサイトカインなど短命な mRNA の AU に富むシーケンスを認識して分解を促進している。TTP は HIV-1 の AU に富むシーケンスを認識して RNA 分解を促進している因子であることが判明した。TTP は活性化 T 細胞において HIV-1 複製を抑制し、HIV-1 抗原提示の低下と免疫系からのマスクを通じエイズ病態に重要な役割を担っている可能性がある。

A. 研究目的

発芽後の HIV-1 RNA には迅速にニックが入ることから HIV-1 RNA は本来、不安定なシーケンスであると考えられる。

HIV-1 RNA の複製について安定性という観点から細胞内へ視点をずらすと

Rev/RRE (rev-responsive element)/Crm1 系による、RNA の迅速な核外輸送がある。この Rev/RRE 複合体による迅速な核外輸送は HIV-1 RNA が AU に富む場合にのみ必要であることも知られている。

HIV-1 RNA の AU をアミノ酸を変えずに減少させると RNA は安定となり、Rev 非依存性になるからである。すなわち

Rev/RRE は AU に起因する RNA 不安定化に拮抗するために必要であると考えられる。本研究では宿主 AU 結合因子 tristetraprolin (TTP) が RNA の不安定化を伴って HIV-1 の複製に影響するかどうかを調べることを目的とした。

B. 研究方法

(ア) HIV-1 の AU に富む領域 (P7) 及びコントロールとして RRE 領域の

RNA をそれぞれ T7 RNA polymerase にて合成し、大腸菌から精製した TTP 蛋白との結合をゲルシフトアッセイで調べた。

- (イ) Un-, single spliced RNA と multiple spliced RNA を区別してコピー数を定量するプライマー、プローブセットを作製した。アクチノマイシン D による転写停止後、時間を追って RNA を抽出し、RT-PCR により定量した。TTP の発現、rev の有無による RNA 安定性への影響を調べた。
- (ウ) TTP の発現による HIV-1 RNA のスプライシングへの影響を定量 RT-PCR により調べた。
- (エ) TTP 発現の HIV-1 翻訳蛋白への影響を調べた。Single spliced RNA の翻訳蛋白として CAT、multiple spliced RNA の翻訳蛋白として luciferase を発現する感染性クローンをを用いた。
- (オ) Rev 依存性にスプライシングが抑制され、CAT 遺伝子の発現を認める系における TTP の発現の影響を調べた。

- (カ) GFP と rev の融合蛋白が TTP の発現によって影響されるかどうかを調べた。

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) TTP は AU に富む合成 RNA へよく結合したが RRE RNA にはほとんど結合しなかった 図 1。
- (イ) Rev の有無、TTP の発現によって multiple spliced RNA の安定性は、影響をうけなかった 図 2 左。
- (ウ) Un-, single spliced RNA の安定性は Rev の存在によって上昇した。TTP は Rev の有無に無関係に un-, single spliced RNA の安定性を減少させた 図 2 右。
- (エ) TTP 発現により multiple spliced RNA に対する un-, single-spliced RNA の比率が低下し、TTP はスプライシングをエンハンスしていることが判明した。
- (オ) Single-spliced RNA 由来の CAT 蛋白は TTP の発現によって減少した。逆に multiple spliced RNA 由来の luciferase 蛋白は TTP の発現により 4 倍に増加した 図 3。
- (カ) GFP 融合 Rev 蛋白は Crm1 阻害剤であるレプトマイシン B によって核外輸送が停止し、核小体へ停留した。しかし TTP 発現によって同様の象は認められないため、Rev 蛋白自体の核外輸送を TTP が抑制してはいないことが判明した。

D. 考察

精製 TTP は HIV-1 の AU に富む RNA に選択的に結合し、TTP の発現により HIV-1 の un-, single spliced RNA の安定性を選択的に低下させたことから、サイトカイン mRNA 同様、TTP は HIV-1 の AU に富んだ RNA を認識し、分解を促進していることが判明した。Gag、CAT と luciferase を利用した翻訳蛋白の定量は以上の結果を裏付け、HIV-1 感染細胞の un-, single spliced RNA 由来蛋白による粒子産生は 20 分の 1 程度まで減少したが、逆に multiple spliced RNA 由来の蛋白は増加した。GFP 融合 Rev 蛋白の観察から、予測どおり、TTP は Rev 蛋白自体に直接作用してはならず、AU に富む RNA 領域を通じた間接的な核外輸送の抑制であると考えた。以上より AU に富む HIV-1 のシーケンスは RNA 不安定性の原因であり、認識して結合する TTP は Rev/RRE による核外輸送へ拮抗して HIV-1 RNA 不安定化を促進している因子であると考えられた。また TTP の発現により multiple spliced RNA の蛋白発現は上昇しているため、細胞の転写、スプライシング、発現等の基本機能には影響を及ぼさず、比較的 HIV-1 特異的に作用しているとも考えられた。さらに TTP は HIV-1 感染活性化 T 細胞において転写後調節により粒子産生を抑制、抗原提示を低下させると同時に nef を増加させ、免疫系から感染細胞をマスクしている可能性が考えられた。

E. 結論

活性化 T 細胞で発現が亢進する

tristetraprolin (TTP)は HIV-1 の AU に富む シークエンスを認識して RNA 分解を促進している因子であることが判明した。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Ueno, T., K. Tokunaga, H. Sawa, M. Maeda, J. Chiba, A. Kojima, H. Hasegawa, Y. Shoya, T. Sata, T. Kurata, and H. Takahashi.** 2004. Nucleolin and the packaging signal, ψ promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol Immunol* **48(2)**: 111-118
2. **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
3. **Harada, T., M. Tatsumi, H. Takahashi, T. Sata, T. Kurata, and A. Kojima.** 2004. Specific reactions between purified HIV-1 particles and CD4(+)cell membrane fragments in a cell-free system of virus fusion or entry. *Microbes Infect* **6(5)**: 421-428
4. **Hasegawa, H., H. Katano, M. Tanno, S. Masuo, T. Ae, Y. Sato, H. Takahashi, T. Iwasaki, T. Kurata, and T. Sata.** 2004. BCL-6-positive human herpesvirus 8-associated solid lymphoma arising from liver and

spleen as multiple nodular lesions. *Leuk Lymphoma* **45(10)**: 2169-2172,

5. **Hasegawa, H., T. Ichinohe, P. Strong, I. Watanabe, S. Ito, S. Tamura, H. Takahashi, H. Sawa, J. Chiba, T. Kurata, and T. Sata.** 2005. Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant. *Journal of Medical Virology*, 2004. *J Med Virol* **75(1)**:130-136

2. 学会発表

高橋秀宗、前田才恵、佐多徹太郎 活性化細胞における mRNA 分解促進を利用した HIV-1 の免疫回避機構 第52回 日本ウイルス学会総会 2004

前田才恵、高橋秀宗、佐多徹太郎 Tristetraprolin (TTP)の Rev/RRE/Crm1 系拮抗による HIV-1 産生の抑制 第27回 日本分子生物学会総会 2004

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 TTPはAUに富むP7合成RNA(左)へRRE RNA(右)に比べよく結合した。

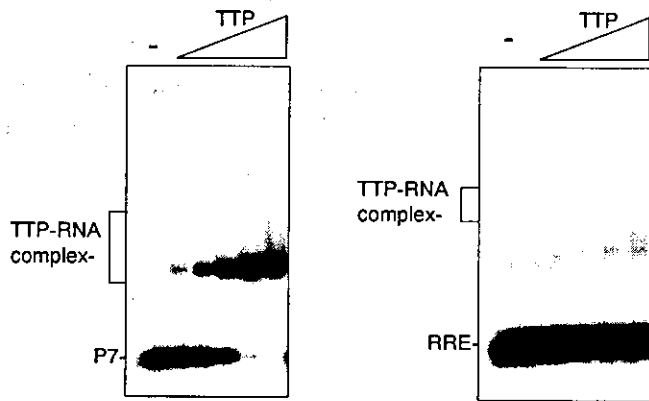


図2 Multiple spliced RNAの安定性はrevの有無、TTP発現の有無による影響を受けなかった(左)。Un-, single spliced RNAの安定性はrevの存在により上昇し、TTPの発現により低下した。

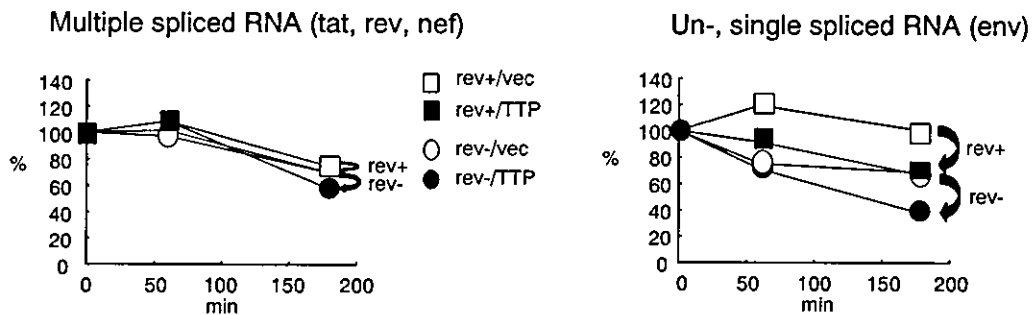
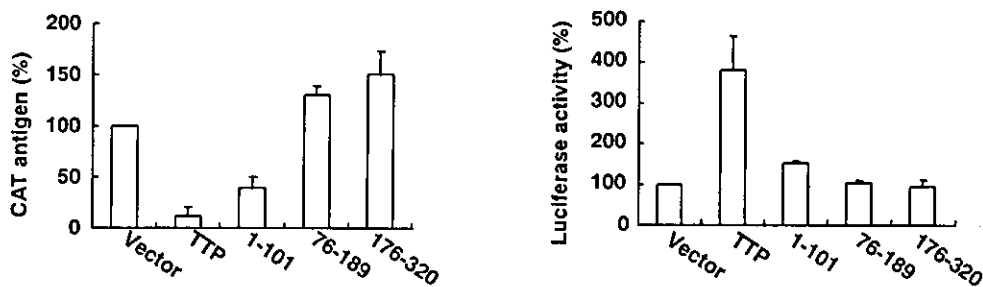


図3 TTPの発現によりsingle spliced RNA由来のCAT発現が低下し、multiple spliced RNA由来のluciferase活性の上昇が認められた。



6. HIV-1 プロテアーゼの耐性変異制御の研究：結晶構造解析

分担研究者 西澤雅子 国立感染症研究所 エイズ研究センター

研究要旨

HIV-1 CRF01_AE(subtype E)プロテアーゼの結晶構造解析する事を目的とし、CRF01_AE プロテアーゼ遺伝子を *E.coli* にトランスフォームしタンパクを発現させた。野生型プロテアーゼには自己分解活性があるため、これを防ぐ目的で 25 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した D25N 変異体を作製し、*E.coli* を用いたタンパク発現及びゲルろ過を用いたタンパク精製・回収の系を確立した。また、CRF01_AE で NFV 耐性との関連が報告されている L10F、N88S の変異体 (D25/L10F、D25/N88S、D25/L10F/N88S) の発現ベクターも併せて構築し *E.coli* での発現を確認した。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)導入は HIV 感染症治療に大きな効果を上げたが、その一方で薬剤耐性ウイルスの出現という新たな問題が注目されるようになった。現在使用されている抗 HIV 薬は欧米先進諸国で流行の主流である subtype B を標的に開発されており、これまでの薬剤耐性に関する研究も subtype B に関するものが主流であった。しかし発展途上国での HIV 流行の主流は non-B であり、タイなど東南アジアにおける HIV 感染症例の主流は CRE01_AE(Subtype E)によるものである。

これまでに、Subtype B と CRE01_AE では抗 HIV 薬に対する薬剤耐性獲得に差異があることがすでに報告されているが、これは Subtype B と CRE01_AE の薬剤標的酵素の構造学的差異を示唆するものであり、Subtype B に関してこれまでに蓄積された情報が non-B には必ずしも通用しない事をも意味している。発展途上国への治療支援という観点から non-B に関して研究を推し進める事は我々にとって重要な課題である。そこで我々は先ず CRE01_AE のプロテアーゼの結晶構造解析を行い、Subtype B の構造と比較し

CRE01_AE の薬剤耐性化機序に関する解析を行う事を目的とした。

B. 研究方法

1) プロテアーゼ変異体の構築 野生型プロテアーゼには自己分解活性があるため活性のあるタンパクを安定して発現・精製する事は困難である。このことから我々は活性中心である 25 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換し、プロテアーゼ活性を失活させた D25N 変異体を作製した。この D25N 変異体と共に NFV 耐性変異体 L10F、N88S を導入した変異体 (D25/L10F、D25/N88S、D25/L10F、N88S) を作製した。

2) 発現ベクターの構築 構築した変異プロテアーゼ遺伝子を pET-11a の T7 プロモーターの下流に組み込んだ。大腸菌での発現を高めるために、このプロテアーゼ遺伝子は lac operon の制御下中にあり IPTG 添加誘導によりプロテアーゼを発現するように設計した (図 1)。

3) プロテアーゼタンパクの発現 *E.coli* (Rosetta)へトランスフォームした後 IPTG の存在下で 3 時間 induction をかけてプロテアーゼタンパクを強発現させた。

4) プロテアーゼタンパク回収・精製

IPTG による発現誘導後 *E.coli* を回収し French press を用い 10,000psi にて菌体を破碎し封入体内のプロテアーゼタンパクを回収した。回収した粗精製産物は 2 M urea で可溶化して封入体を回収し、その後封入体を酢酸で可溶化した。可溶化したプロテアーゼ粗精製物は、G-75 Sephadex を充填した 5 cm x100cm column に添加し、ゲルろ過による分離精製を行った。流速は自然落下で分画採取を行った。

C. 研究結果

1) 変異プロテアーゼの発現・精製

pEG-11a をトランスフォームした *E.coli* Rosetta を IPTG 存在下で培養した後、菌体を回収して可溶化し、SDS-PAGE で流して gel を CBB 染色してプロテアーゼタンパクの発現を確認した。その結果、10 k Da の位置にタンパクのバンドが検出された。また抗プロテアーゼ抗体を用いた WB による確認で、当該バンドがプロテアーゼタンパクである事が確認できた (図 2)。ゲルろ過で経時的に回収してきた分画を 280nm でモニターし、約 140 時間目からピークが確認できた (図 3)。確認できたピークに相当する分画を回収し、

これらについて SDS-PAGE を行い、ゲルを CBB で染色した結果、10kDa のプロテアーゼに相当するバンドが回収・精製できていることが確認できた。また WB の結果、このバンドがプロテアーゼである事を確認した (図 4)。回収したタンパクを refolding 後透析・濃縮してタンパク量を測定した結果、出発時点の菌重量の約 1/1000 がプロテアーゼタンパクとして回収できている事が確認できた (表 1)。NFV 耐性変異プロテアーゼとして構築した変異体 D25/L10F、D25/N88S、D25/L10F/N88S の発現ベクターを *E.coli* にトランスフォームして、菌体内での発現を確認した結果、全ての変異体で発現が確認できた (図 5)。

D. 考察

本年度は、活性中心に変異を入れプロテアーゼ活性を失活させた D25N 変異体の回収・精製に成功した。今後は、この精製プロテアーゼにプロテアーゼインヒビターを結合させて X 線結晶構造解析を行う。しかし活性中心に変異が入っていないプロテアーゼとプロテアーゼインヒビターの結晶構造解析を行う事が重要であると思われたため、次年度は活性中心から

離れた部位に変異を入れて自己分解活性を低下させたプロテアーゼ変異体の発現・回収・精製を試みる。現在自己分解活性を抑制すると報告のある 7 番目のアミノ酸をグルタミンからリシンに置換した Q7K の変異体の発現ベクターを構築し、*E.coli*での発現を確認中である。

E. 結論

CRF01_AE のプロテアーゼについて、活性中心に変異を導入した D25N 変異プロテアーゼの発現・回収・精製法を確立した。X 線結晶構造解析に必要なタンパク量が 20mg であることから、D25N 変異体に関して結晶化に十分量のタンパクが回収・精製まで完了した。また NFV 耐性変異を導入した D25/L10F、D25/N88S、D25/L10F/N88S プロテアーゼタンパクの *E.coli*での発現を確認できた。

F. 研究危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1)論文発表

なし

2)学会発表

なし

3) 特許の出願

なし

表 1

protease	菌pellet (g)	ゲル濾過前蛋白 (mg)	refolding,透析、濃縮後蛋白 (mg)
D25N	13.2	52.5	15.8
	24.2	56.0	9.0
	15.3	65.6	17.8

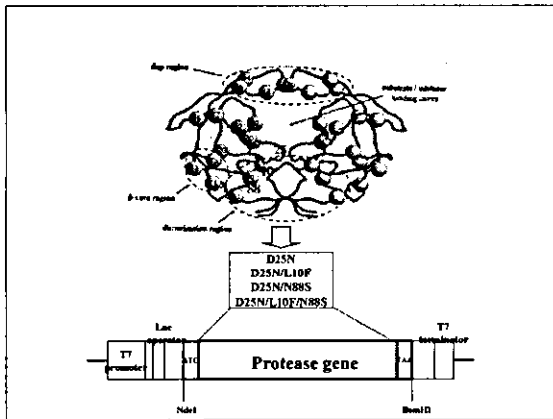


図 1

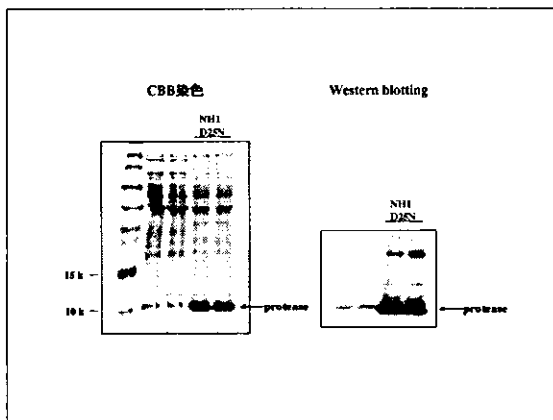


図 2

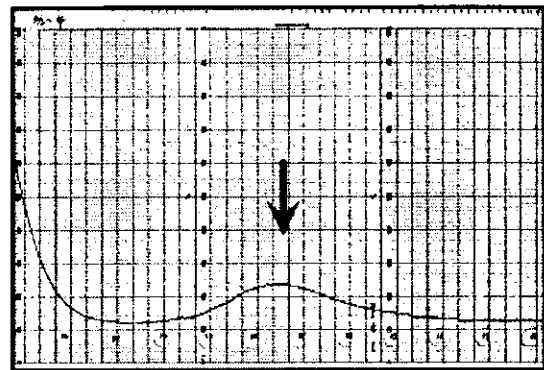


図 3

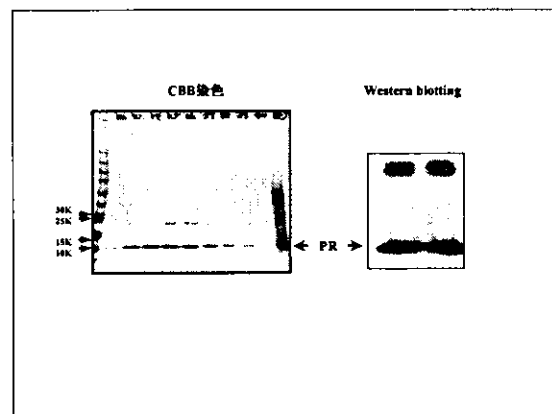


図 4

7. Tatによる OGG1 発現誘導と HIV のゲノム保持機構

分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学）

研究要旨：Tat 発現に伴う遺伝子発現プロファイルの変化を追求した。その結果、酸化ストレスに伴う DNA (guanine) 修飾の修復酵素 OGG1 遺伝子の誘導が明らかになった。その分子遺伝学的解析の結果より、Tat は OGG1 転写の抑制因子である AP4 に結合し、AP4 を OGG1 プロモーターから遊離させることによって、OGG1 の転写を誘導することがわかった。一方、Tat の発現に伴って細胞内酸化ストレスは著明に増加していた。それにも関わらず DNA の酸化修飾によって生ずる 8-OH-dG の量は Tat 発現によって低下した。これらのことから、Tat は OGG1 を誘導することによってウイルス複製に伴う酸化ストレスによる遺伝子変異をあらかじめ抑制する作用を持つことが明らかになった。

A. 研究目的

Tat は HIV の増殖に必須の転写活性化因子であるが、がん化促進、免疫抑制、酸化ストレス誘導作用等を有することが報告されており、HIV 感染症の進展に多面的な影響を及ぼしている。その分子機構を追究するために、遺伝子発現プロファイル解析を実施し Tat 被制御遺伝子を包括的に検索した。その結果、OGG1 の発現誘導を認めたので HIV 感染における意義を追求した。

（倫理面への配慮）

本研究には該当せず。

B. 結果

(1) Tat は DNA glycosylase である OGG1 遺伝子発現を誘導する。

Tat 被制御遺伝子を解析するにあたり、Ponasteron A (pon A) で Tat および mutant Tat(mTat)の発現を制御できる細胞株を新たに樹立した。樹立した細胞において pon A 特異的な Tat および mTat の発現が Western blot(WB)法で確認でき、Tat 誘導細胞においては HIV-1 遺伝子の活性化と Cyclin T1 との結合も認められた。本細胞を用いて Tat 非誘導時、誘導後の遺伝子発現プロファイルを相互に比較を行った結果、酸化ストレス DNA 傷害に対する repair enzyme である OGG1 が Tat によって最も強く発現誘導を受けていた。RT-PCR およびリアルタイム PCR によって遺伝子レベル、WB において蛋白レベルでの OGG1 の発現誘導が確認で

きた(Fig. 1)。

2) Tat は OGG1 promoter 上の AP-4 結合サイトに作用し OGG1 の発現を直接誘導する。

Tat は酸化ストレスを誘導することが知られており、Tat が酸化ストレスを介して OGG1 の発現を誘導していることが推察された。実際に Tat 発現細胞においては細胞内レッドクスバランスが酸化方向にシフトしていた。しかしながら、抗酸化剤を前処理しても Tat による OGG1 誘導作用は認められた。さらに、酸化ストレスのインデューサーである H_2O_2 や TNF- α 等は OGG1 の発現を誘導しなかったことから、Tat は直接 OGG1 の発現を誘導していることが推察された。実際に、OGG1 promoter を用いて Luciferase assay を行った結果、Tat は OGG1 promoter を活性化した。さらに、OGG1 promoter 上の責任領域を決定するために種々の変異 OGG1 promoter を作製し Tat の作用を検討した。その結果、5'末端側の AP-4 結合サイトを変異させた promoter においては Tat の効果が認められなくなった(Fig. 2)。さらに興味深いことに本 promoter においては basal level での転写活性が上昇していた(Fig. 2)。以上の結果から、AP-4 は OGG1 の発現において negative に作用しており、Tat は AP-4 による阻害作用を解除している可能性が推察された。実際に OGG1 promoter とともに AP-4 を強発現させると、Tat による活性化作用と basal level での転写活性が抑制された。