

(3) Tat は AP-4 と相互作用し AP-4 の OGG1 promoter への結合を抑制する。

AP-4 は HLH 型転写因子で GC box に結合しいくつかの遺伝子発現を促進または抑制することが報告されているが、そのメカニズムや相互作用因子等の解析はなされていない。そこで、AP-4 の DNA 結合能に対する Tat の作用を *in vitro* において EMSA にて検討した。その結果、Tat の発現量に依存して AP-4 の DNA 結合能が低下した。次に Tat と AP-4 が相互作用する可能性を推察し *in vivo* において IP-WB assay を行ったところ、Tat は内在性の AP-4 と結合した。以上の結果は、OGG1 promoter 上の AP-4 結合サイトを用いた ChIp assay においても認められ(Fig. 3)、Tat が AP-4 と相互作用することにより AP-4 の OGG1 promoter への結合を抑制している可能性が示唆された。

(4) Tat は細胞内 8-oxo-dG 産生を抑制する。

酸化ストレスは酸化型 guanine である 8-oxo-dG を誘発し G:C から T:A への transversion を起こすことが知られている。OGG1 は 8-oxo-dG を除去することにより transversion による DNA の変異を阻止している。実際に OGG1 ノックアウトマウスにおいては OGG1 による修復機構が働かないため 8-oxo-dG 量が上昇することが報告されている。Tat が OGG1 の発現を誘導しことから、8-oxo-dG 量を HPLC-EC 法にて測定した。その結果、Tat の発現量とともに 8-oxo-dG 量が非発現細胞の baseline level よりも有意に低下していた(Fig. 4)。他方、トランス活性化能を失った mTat 発現細胞においては、OGG1 遺伝子の発現誘導作用および上記の抑制作用は見られなかった。以上の結果から、Tat により誘導された OGG1 が作用し 8-oxo-dG 量が低下していることが推察された。

C. 考察

Tat は宿主のレドックスバランスを酸化方向にシフトし HIV の転写に対して有利に働く一方で、あらかじめ OGG1 を誘導することによって Transversion による HIV-1 のゲノム変異を未然に防止している(feed-forward)可能性が示唆された。また、最近

APOBEC3G/CEM15 による HIV ゲノム変異(G:C から A:T への transition)を Vif が抑制していることが報告されたが、今回の結果から Tat も Vif とともに HIV ゲノムの安定性に関与していることが推察された。

D. 結論

Tat の新たな機能として、OGG1 の発現を介して HIV ゲノムの安定性に関与しうることが示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

1) Takahashi, N., Kobayashi, S., Jiang, X., Kitagori, K., Imai, K., Hibi, Y., and Okamoto, T. :Expression of 53BP2 and ASPP2 proteins from TP53BP2 gene by alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 315:434-438, 2004.

2) Tetsuka, T., Uranishi, H., Sanda, T., Asamitsu, K., Yang, J-P., Wong-Staal, F. and Okamoto, T. : RNA helicase A interacts with nuclear factor-[[kappa]]B p65 and functions as a transcriptional coactivator. *Eur. J. Biochem.* 271: 3741-3751, 2004.

3) Tozawa, K., Okamoto, T., Kawai, N., Hashimoto, Y., Nagata, D., Hayashi, Y. and Kohri, K. :Positive correlation between sialyl Lewis X expression and pathological findings in renal cell carcinoma. *Kidney Int.* 2005. (in press)

4) Sanda, T., Iida, S., Ogura, H., Asamitsu, K., Murata, T., Bacon, K.B. Ueda R. and Okamoto, T.: Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel Ikb kinase inhibitor. *Clin. Can. Res.* 2005 (in press)

5) Kobayashi, S., Kajino S., Takahashi, N., Kanazawa, S., Imai, K., Hibi, Y., Ohara, H., Itoh M. and Okamoto, T. : 53BP2 induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. *Genes Cells* 2005 (in press)

6) Okamoto, T. : The epigenetic alteration of synovial cell gene expression in rheumatoid

arthritis and the roles of NF- κ B and Notch signaling pathways. *Modern Rheum.* 2005 (in press)

2. 学会発表

1) Okamoto T, Shuhei U, Asamitsu K, Kondo T : Bioinformatic determination of the Tat/TAR/Cyclin T1 multimolecular transactivation complex. 6th EMBL Transcription Meeting 2004年8月28日~9月1日、Germany

2) Asamitsu, K., Ishida, H., Ueno, S., Kondo, T., Okamoto, T.: Prediction of 3D structure of Tat/TAR/Cyclin T1 complex using molecular docking simulation. 第27回日本分子生物学会 2004年12月8日~11日、神戸

3) Hibi, Y., Hamano, T., Matsuo, K., Takahashi, N., Mabuchi, Y., Soji, T., Hara, T., Yamamoto, N., Honda, M., Okamoto, T.: A single nucleotide synonymous mutation in gag gene in seronegative cases of HIV-1 infection. 第27回日本分子生物学会 2004年12月8日~11日、神戸

4) Victoriano, B. A. F. Asamitsu, K., Hibi, Y., Murata, T., Bacon, K. B. Okamoto, T.: Inhibition of HIV-1 replication in HIV-1 latently infected cells by a novel IKK inhibitor 第18回日本エイズ学会 2004年12月9日~11日、静岡

5) Okamoto, T.: Computational analysis of the 3D structure of Tat/TAR/P-TEFb complex as a molecular target of novel anti-HIV therapy. 第18回日本エイズ学会 2004年12月9日~11日、静岡

6) Okamoto, T.: Bioinformatics resolution of TAT/TAR/CYCLIN T1 complex that determines HIV replication. The 31st Annual Convection of The Philippine Society for Biochemistry and Molecular Biology 2004年12月3日~4日、Philippine

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願中)

岡本 尚、田中清隆、長谷川順一: NF- κ B 活性化抑制剤 (特願 2004-3727) (特願 2004-3728)

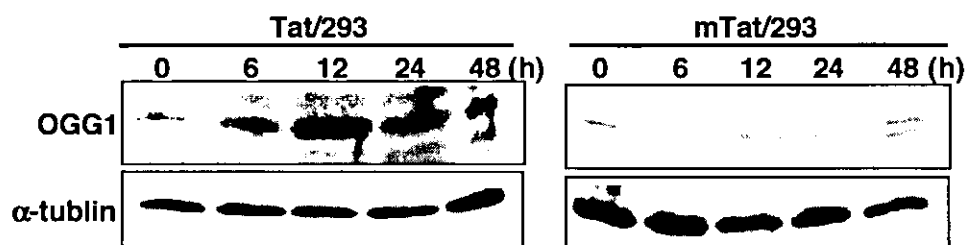


Fig. 1 Tatにより OGG1 の誘導発現が起こるが、mTat ではその効果はない。

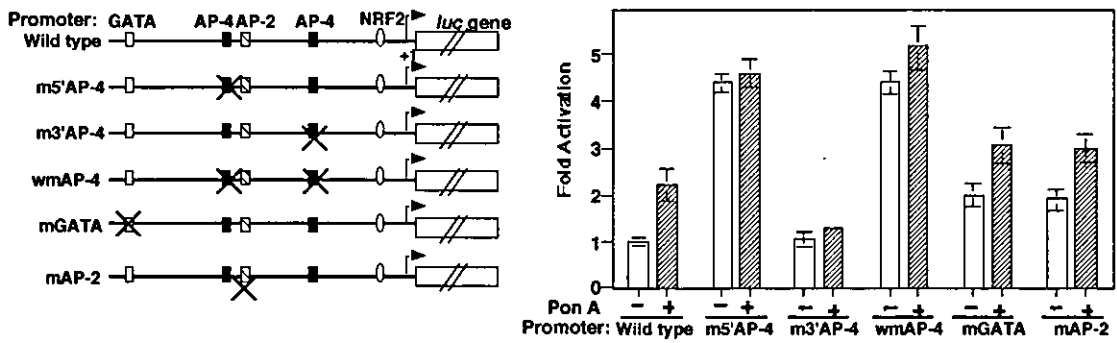


Fig. 2 OGG1 promoter の 5 末端側 AP-4 結合部位(m5'AP-4)を変異させると、Tat の活性化作用が認められなくなり、basal level での OGG1 遺伝子の活性が上昇した。

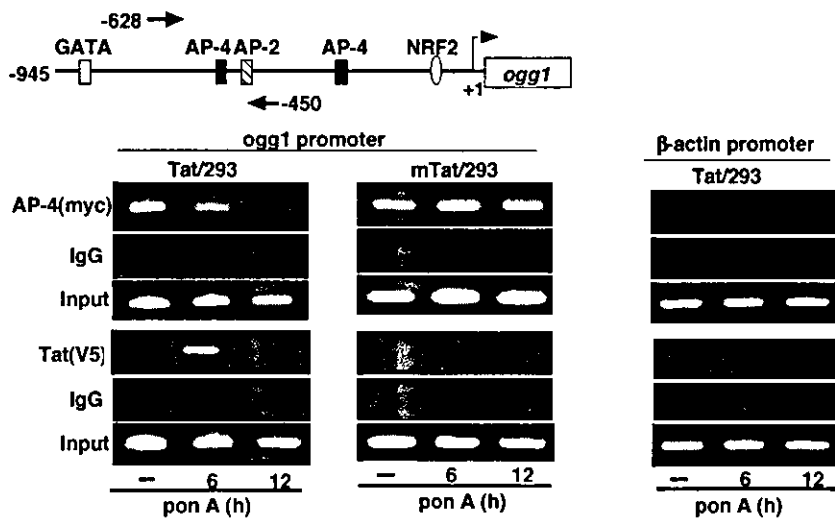


Fig. 3 ChIP assay の結果。Tat 発現に伴い AP4 の DNA との結合が消失した。

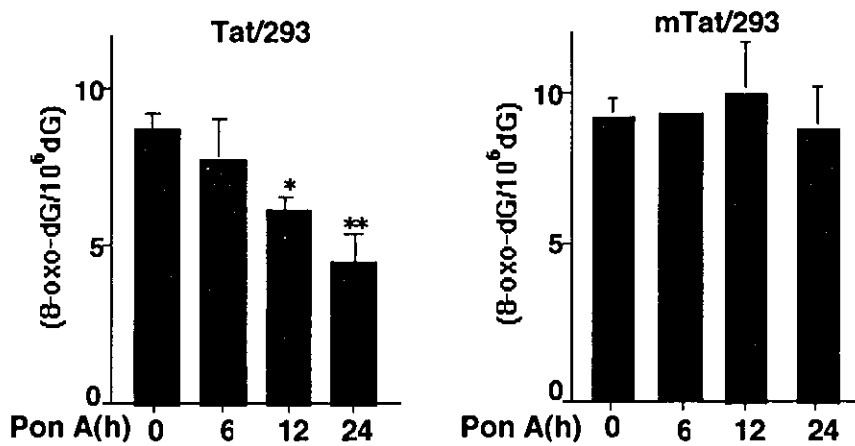


Fig. 4 Tat の発現にともない 8-oxo-dG 量が低下した。

1. HIV-1 細胞侵入制御；脂質二重膜流動性制御因子の探求

分担研究者 原田信志 熊本大学大学院医学薬学研究部感染防御 教授

研究要旨 HIV-1 の multiple-site binding が感染成立に必要であり、この成立に細胞膜とウイルスエンベロープの流動性が関与していると考えられることから、細胞膜とエンベロープの流動性を電子スピンドラベル法で測定した。細胞膜に比較するとエンベロープの流動性は有意に低く、これはエンベロープのコレステロール含量が高いためであった。細胞膜の流動性と HIV-1 の感染性は相関関係にあり、流動性が 5%増加すると感染価は 2.4 倍、5%低下すると HIV-1 感染は 56%抑制された。高温やキシロカインで誘導される吸着後の HIV-1 感染増強は CXCR4 のアンタゴニスト T140 で阻止されることから、multiple-site binding が感染増強に作用していると考えられた。今後、膜流動性を抑制することによる感染阻止の方策を追求する。

A. 研究目的

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

我々は HIV-1 の吸着と侵入には multiple-site binding (MSB)が必要であると仮定した。この MSB には細胞膜とウイルスエンベロープ (両者共、脂質二重膜) の流動性が関与しており、ウイルスの侵入に必要な fusion pore の形成に重要と思われる。

本研究では、これまでの実験結果をさらに確認するため、細胞膜と HIV-1 エンベロープの流動性を細かく測定した。また、細胞膜の流動性を修飾する因子を HIV-1 吸着時に作用させ、膜流動性と HIV-1 感染性との関連を追求した。以上の研究により、HIV-1 の吸着と侵入 (つまり感染) に関連

している要因を明らかにし、新しい感染制御の方策を探る。

B. 研究方法

1. 細胞とウイルス：GHOST/CXCR4 細胞、MT-2 細胞、および HIV-1 の持続感染細胞である MOLT-4/C-2 細胞を使用した。ウイルスはルシフェラーゼ遺伝子を有し NL43 の env(X4)で pseudotyping した NL43-luc ウイルスを用いた。
2. 感染価の測定：GHOST/CXCR4 細胞と NL43-luc ウイルスを使用し、感染後 2 日目にルシフェラーゼ活性を測定した。
3. ウイルス吸着量の測定：細胞に吸着した HIV-1 の定量は p24 抗原を ELISA 法で測定することで行った。
4. 抗体と試薬：抗 V3 抗体、抗 HLA-II 抗体を使用した。d- α -phosphatidylcholine dipalmitoyl(DPPC)、キシロカイン、detergent である Tween20 等を用いた。
5. 細胞膜流動性の測定：5-doxyyl stearic acid と細胞を室温で 20 分間反応させ、PBS で 3

回洗浄した。その後、細胞膜に取り込まれた 5-doxy stearic acid の動きを電子スピンラベル(ESR)法で解析した。細胞膜の流動性は ESR の波形により order parameter (S) として算出した。

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

(倫理面での配慮はこの研究では必要ない)

C. 研究結果

1. 細胞膜とエンベロープ流動性の測定：

細胞膜とエンベロープの流動性を 5-doxy stearic acid を用いた電子スピン共鳴法 (ESR) で測定した (図 1)。細胞膜の流動性 order parameter は 0.582~0.598 であった。一方、ウイルスエンベロープの order parameter は 0.685~0.738 で、細胞膜より流動性の低い硬い膜であった。

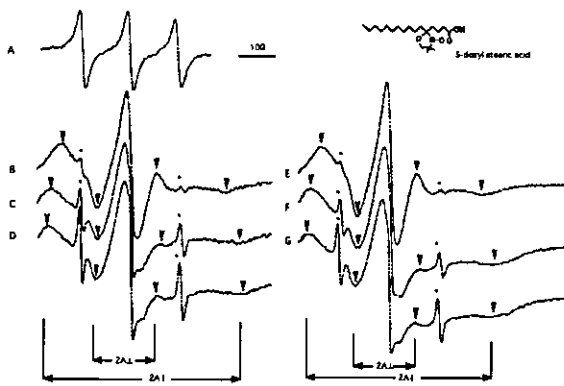


図 1 ESR を用いた細胞膜とエンベロープの流動性；

A; Free の 5-doxy stearic acid. B; MOLT/C-2 細胞で order parameter は 0.611. C; HIV-1 C-2 ウイルスで 0.729. D; CD45-depleted C-2 ウイルスで 0.776. E; MT-2 で 0.585. F; C-2(MT-2) ウイルスで 0.704. G; CD45-depleted C-2(MT-2) で 0.721.

ウイルスのエンベロープでは細胞膜よりコレステロールの含量が高く、このことが膜の流動性を低くしていると考えられた。また、HIV-1 はコレステロール含量の高い膜部分 raft から選択的に出芽していることを

示している。細胞膜およびエンベロープの流動性は温度依存的であり、低温では低く、高温では高かった。ESR を用いることにより、正確に生細胞の膜とウイルス粒子エンベロープの流動性を測定できた。

2. 膜流動性と HIV-1 感染性の関連：

細胞膜の流動性に影響をあたえる因子であるキシロカイン、DPPC などを作用させ、細胞膜と HIV-1 感染性との関連を求めた。細胞膜の流動性が亢進すると、対数的に感染性は増加した。流動性が 5%増加すると感染価は 2.4 倍、5%低下すると HIV-1 感染は 56%抑制された (図 2)。このように細胞膜あるいはエンベロープの僅かな流動性の変化は、HIV-1 の感染成立に大きく反映されることがわかった。細胞膜流動性を抑制する物質は、少なくとも HIV-1 の感染を阻害するものとして使えることも示唆された。

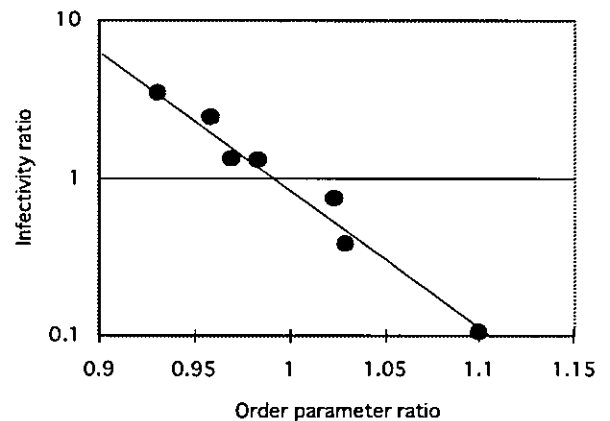


図 2 膜流動性と HIV-1 の感染性との関連：

図の左から、40°C処理、0.2% xylocaine、0.05% Tween 20、200 μg/ml DPPC、10 μg/ml DPPC、anti-HLA-II、25°C処理を示している。

細胞に室温で HIV-1 を吸着させ洗浄後、40°C あるいはキシロカイン (37°C) で 1 時間処理すると、感染価の増加が認められる。この吸着後感染増強は、高温あるいはキシロカイン処理時に CXCR4 のアンタゴニスト

である T140 を加えると完全に抑制される。このことは、高温やキシロカインによる膜流動性の亢進が、室温下で細胞にゆるやかに吸着したウイルスのエンベロープの流動性をも亢進させ、multiple-site binding を促進させたと思われる。また、T140 で感染増強が阻止されることから、multiple-site binding が起こっていると考えた。

3. HIV-1 gp120 の不均一性：

室温、37°C、40°Cで吸着し感染可能なウイルスは、ある特定のウイルス群が選択されているのか、あるいは偶然の確率で感染価が増加していくのか検討した。ウイルスを中和抗体であるいは細胞を T140 で処理し、その後、室温、37°C、40°Cで吸着を行い、それぞれのウイルスの抗体や T140 に対する感受性が同じか、異なるかで gp120 の不均一性が証明できるか試みた。室温吸着で感染可能なウイルスは、抗 V3 中和抗体や T140 に対して感受性が低かった。このことは、通常のウイルスサンプルは必ずしも均一ではなく、吸着時の温度の条件で、ある一定の性質を持ったグループが選択されると考えられた。つまり、低温吸着の条件では膜流動性が低く、感染に十分な multiple-site binding を形成するためには、ウイルスが多くの gp120 あるいは多くの functional gp120 を持っている方が感染成立のためには有利である。このような多くの gp120 を持った HIV-1 は、また、中和抗体や T140 に耐性であると考えられた。

D. 考察

以上のデータは multiple-site binding が感染に重要であり、それを左右する因子として膜の流動性とウイルスの gp120 の量が考えられた (図 3)。Fusion pore の形成に multiple-site binding が必要だという概念は、ほとんどのエンベロープを有するウイルスに適用できる。従って、細胞膜あるいはエ

ンベロープの流動性を制御することにより、エンベロープを有する多くのウイルスの感染をコントロールすることが可能であろう。コレステロールの脂質二重膜内での存在は膜の流動性を liquid ordered、つまり低下させることが良く知られている。コレステロールそのものは、直接ウイルスに作用させても感染性に影響を与えないという報告もあるが、コレステロール類似の構造を持った分子で、多くのエンベロープウイルスに抗ウイルス作用を持つものをスクリーニングして、その作用機序を解明すべきであろう。

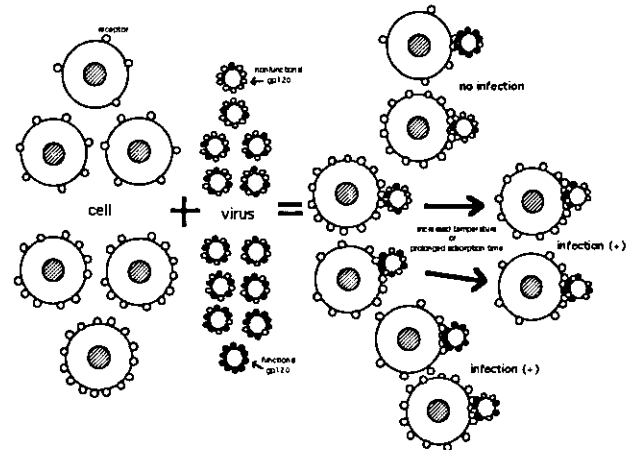


図 3 感染成立のための multiple-site binding の仮説

E. 結論

細胞膜の流動性は HIV-1 の gp120/レセプターの集合 multiple-site binding (MSB) に重要である。この MSB は結果的には fusion pore の形成に必要である。今後、細胞膜あるいはウイルスエンベロープの流動性を制御 (抑制) する物質を選択し、広範囲のエンベロープウイルスに有効な抗ウイルス剤の開発を試みる。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kumagai, K., M. Tominaga and S. Harada. 2004. Sensitivity of chronically HIV-1 infected HeLa cells to electrical stimulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 475-478.
- 2) Maeda, Y., S. Harada, A. Tempaku, S. Harada, and K. Yusa. 2004. Persistence of mutations during replication of an HIV library containing combinations of selected protease mutations. *Antiviral Res.* 61: 173-180.
- 3) Harada, S., T. Akaike, K. Yusa, and Y. Maeda. 2004. Adsorption and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 are modified by the fluidity of the plasma membrane for multiple-site binding. *Microbiol. Immunol.* 48: 347-355.
- 4) Harada, S., K. Yusa, and Y. Maeda. 2004. Heterogeneity of envelope molecules shown by different sensitivities to anti-V3 neutralizing antibody and CXCR4 antagonist regulates the formation of multiple-site binding of HIV-1. *Microbiol. Immunol.* 48: 357-365.
- 5) Yusa, K., and S. Harada. 2004. Acquisition of multi-PI (protease inhibitor) resistance in HIV-1 in vivo and in vitro. *Current Pharmaceutical Design* 10: 4055-4064.

2. 学会発表

- 1) 原田信志、門出和精、遊佐敬介、前田洋

助；HIV-1 の中和抗体によるエンベロープ膜流動性の抑制、第 52 回日本ウイルス学会総会、2004 年 11 月、横浜。

- 2) 前田洋助、遊佐敬介、原田信志；アフリカミドリザル由来 TRIM5 α の HIV 感染抵抗性の解析、第 52 回日本ウイルス学会総会、2004 年 11 月、横浜。
- 3) 門出和精、原田信志、前田洋助、遊佐敬介；CCR5 発現量の異なる CD4 陽性 T 細胞株に adapt した HIV-1 の分離とその性質、第 52 回日本ウイルス学会総会、2004 年 11 月、横浜。
- 4) 原田信志；HIV-1 感染と膜流動性：multiple-site binding は感染に必須か？第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月、静岡。
- 5) 前田洋助、遊佐敬介、原田信志；CCR5、CXCR4 両コレセプター発現細胞における R5X4 HIV-1 の CXCR4 アンタゴニスト感受性は V3 領域の単一アミノ酸によって決定される、第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月、静岡。
- 6) 遊佐敬介、前田洋助、原田信志；感染者由来 HIV-1 プロテアーゼライブラリーを用いた薬剤耐性関連変異の予測、第 18 回日本エイズ学会総会、2004 年 12 月、静岡。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし。

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者 原田信志

書籍

著者氏名	論文 タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版 地	出版 年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kumagai,K., M.Tominaga S.Harada.	and Sensitivity of chronically HIV-1 infected HeLa cells to electrical stimulation.	Appl. Microbiol. Biotechnol	63	754-758	2004
Song,W., Y.Maeda, A.Tempaku, S.Harada, K.Yusa	and Persistence of mutations during replication of an HIV library containing combinations of selected protease mutations.	Antiviral Res.	61	173-180	2004
Harada,S., T.Akaike, K.Yusa, and Y.Maeda.	Adsorption and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 are modified by the fluidity of the plasma membrane for multiple-site binding.	Microbiol. Immunol.	48	347-355	2004
Harada,S., K.Yusa, and Y.Maeda.	Heterogeneity of envelope molecules shown by different sensitivities to anti-V3 neutralizing antibody and CXCR4 antagonist regulates the formation of multiple-site bundling of HIV-1.	Microbiol. Immunol.	48	357-365	2004
Yusa,K., S.Harada.	and Acquisition of multi-PI (protease inhibitor) resistance in HIV-1 in vivo and in vitro.	Current Pharmaceuti cal Design	10	4055- 4064	2004

2. V3 ループペプチドのCD解析と SDA-1 env 発現偽ウイルスの作成

服部俊夫 東北大学大学院医学系研究科感染病態学分野 教授

研究協力者 宇佐美修 肖鵬 斎藤弘樹

研究要旨

HIV の V3 領域は感染に際し重要な役割を果たすと考えられている。V3 ループのCD解析をした結果を示す。またニューモシスチス・カリニ肺炎患者に由来した HIV (SDA-1) の gp160 を発現する偽ウイルスを作成し種々の HIV 補受容体発現細胞への親和性を検討した結果多種類の補受容体を発現することを明らかにした。

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。我々は昨年 V3 ループペプチドの細胞膜への結合にN端が必須であること。トロンビンにより gp120 が活性化されることなどを明らかにしてきた。今回は合成ペプチドの CD 解析及びニューモシスチス・カリニ肺炎患者に由来した HIV(SDA-1)が様々な補受容体を使用することを報告する。

B.材料・方法

CD解析: 昨年までに報告した合成ペプチド BH-10, 98.6, ADA 株由来の合成V3ループペプチドを用いた。円偏光分散系は日本分光-720 型を用いた。(東北大学生命薬学: 竹内英夫先生研究室にて施行した。)

ウイルス分離: 当科に入院したニューモシスチス・カリニ肺炎合併エイズ患者の末梢血リンパ球を正常人由来リンパ球と共培養することにより新たな HIV ウイルス SDA-1 を得た。

偽ウイルス作成: HIV ウイルスを鋳型として、SDA-1env cDNA(2900bp)を Nested-PCR

法により増幅し、SDA-1env 発現プラスミド(pSM-SDA-1)を作成した。これを、ルシフェラーゼ発現プラスミッド pNL4-3-Luc-E-R-と 293 T細胞に共導入することで SDA-1env 発現偽ウイルスを作成した。

多数の補受容体発現細胞: 群馬大学星野教授より種々の補受容体を発現している CD4/NP2 細胞株を得て、SDA-1 への感染性を検討した。

C 研究結果

CD解析: リン酸ナトリウム緩衝液の存在下でこれらのペプチドは 198 nm 付近に強い負のピークがあり不規則な構造をとっていた。TFEの含量を20%にすると三種類のペプチドはともにアルファヘリックス構造を表すが、特にPH2.5ではADA, 89.6のみにより多くのアルファヘリックス構造が現れた。

SDA-1 env 発現偽ウイルスの HIV-1 レセプター発現細胞への親和性: 図1に示すように、SDA-1env 発現偽ウイルスは U87.CD4.CXCR4 および U87.CD4.CCR5 にウイルス濃度依存性に感染が確認された。図2に示すように、NP2.CD4.CCR5, NP2.CD4.CXCR4 以外にも NP2.CD4.CCR3, NP2.CD4.CCR8 で有意な偽ウイルスの細胞

親和性が認められ、図3で示すように、ウイルス濃度依存性に感染がみとめられた。

D. 考察

以上の実験により3種類のV3ループペプチドは脂溶性の状態でアルファヘリクス構造を示し、R5に感染するADA、と98.6はPH2.5でより構造に変化が現れた。SDA-1env 発現偽ウイルスを用いることで、CD4, CXCR4, CCR5 以外のレセプターとして、CCR3, CCR8 があらたな HIV レセプターとして機能している可能性が示唆された。SDA-1 の V3 領域は、Table に示されるように他の HIV 株とアミノ酸配列が異なっており、これによる構造の変化がレセプター親和性の違いとなってあらわれていると考えられる。今後 SDA-1 の V3 ループを合成し、その構造の解析をすることにより V3 ループの構造・機能から見た感染阻止物質の発見に努めたい。また PCP 肺炎由来の HIV にはより広範囲な補受容体を使用する可能性があることが示された。

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。

SDA-1 のレセプターとして、CCR3, CCR8 があらたな HIV レセプターとして機能している可能性が示唆された。

G. 研究発表

論文発表

1. Ling H, Xiao P, Usami O and Hattori T.: Thrombin activates envelope glycoproteins of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and enhances fusion. *Microbes and Infection* 6:414-420, 2004
2. H Ling, T. Hattori, H-X Gu, J. Ashino, Y-C Liu, C. Liu Surveillance of humoral immune

response to TBGL in TB and HIV infected individuals. *Proceeding of XV International AIDS Conference, 2004 Bangkok E710L7812*

3. Usami O, Xiao P, Ling H, Lui I, Naksone T, and Hattori T. Properties of anti- gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1 infected patients *Microbes and Infection in press*

学会発表

1) T. Hattori, P. Xiao, O. Usami, H. Ling. Thrombin activates envelope glycoproteins of HIV-1 and enhances fusion.

XV International AIDS Conference, Bangkok, Thailand, 11-16 July 2004, 1: 301[TuPeA4302]

2) H. Ling, T. Hattori, H.X. Gu, Y. Ashino, Y.C. Liu. Humoral immune responses to Tuberculosis Glycolipid Antigen (TBGL) in TB patients and in HIV positive individuals in Heilongjiang province, China.

3) O. Usami, X. Peng, H. Ling, T. Hattori

The conformational property of an-HIV-1 envelope protein gp41 core structure monoclonal antibodies.

XV International AIDS Conference, Bangkok, Thailand, 11-16 July 2004, [B12560]

2004 International Meeting of the Institute of Human Virology Oct 31- Nov 4, 2004

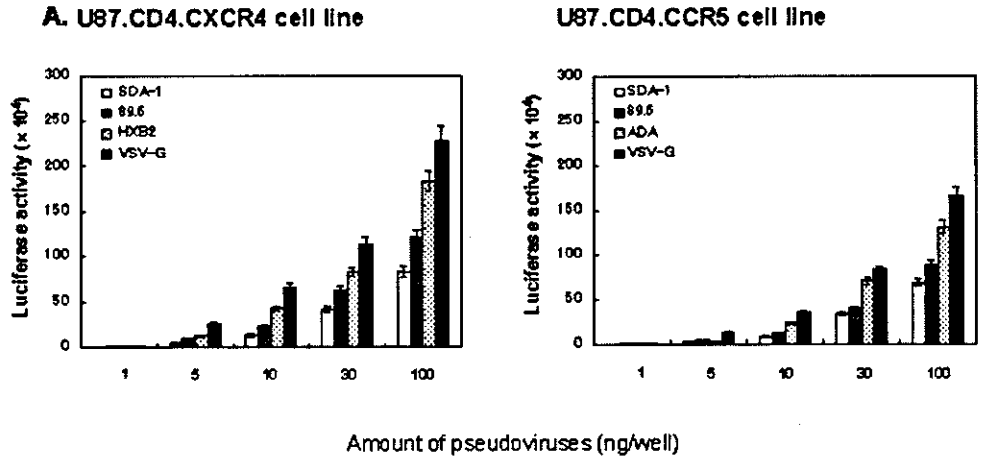


Fig 1. Primary tropism of SDA-1 pseudoviruses and dose-dependent infectivity in U87.CD4.Co-R cell lines

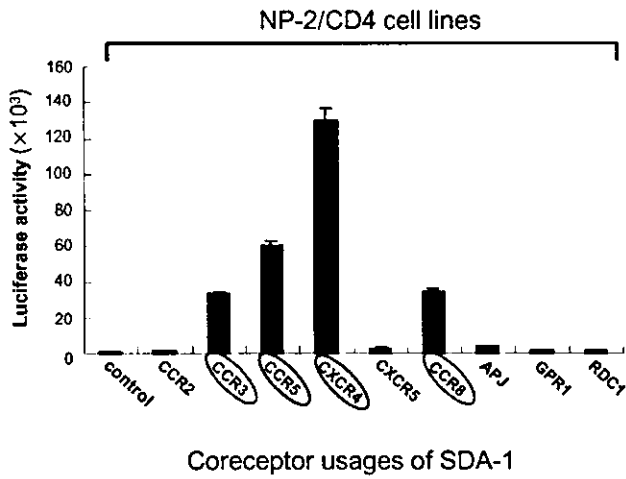


Fig 2. Other coreceptors usage of SDA-1 pseudoviruses in NP-2.CD4.Co-R cell

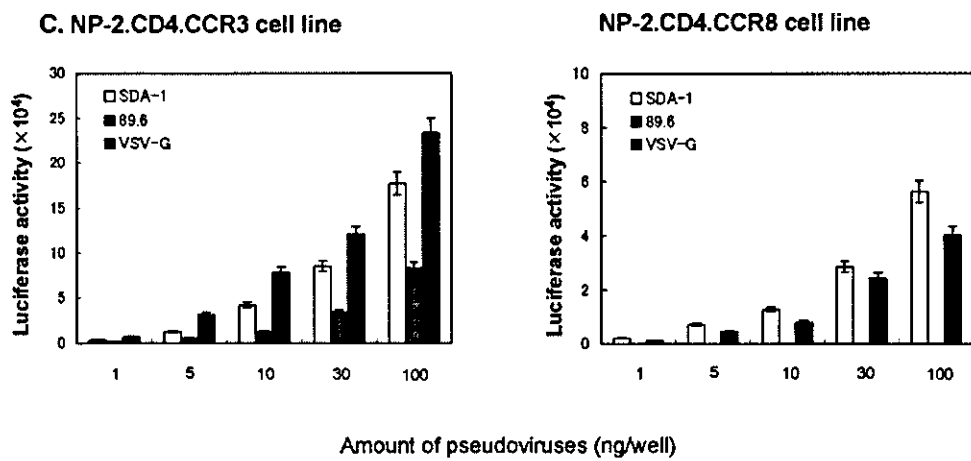


Fig 3. Other tropism of SDA-1 pseudoviruses and dose-dependent infectivity in NP-2.CD4.Co-R cell lines

Table . V3 sequences of SDA-1

Strain	Amino acid sequence
Consensus	SVEINCTRPNNNTRKSIHI..GPGRAFYTTGEIIGDIRQAHCNISRA
IIIB (X4)	-----R-R-QR-----V-I-DK--NM-----
BH10 (X4)	-----R-QR-----V-I-K- -NM-----
ADA (R5)	-----T
89.6 (R5X4)	--V-----RRLS-.....ARRN-----
SDA-1	--A-----R-TM.....VY----G-V-----T

厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究）
分担研究報告書

3. HIV侵入過程の蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）法を用いた解析

分担研究者 小島 朝人 国立感染症研究所・感染病理部・室長
協力研究者 飛梅 実 国立感染症研究所・感染病理部・研究員

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、侵入の分子機構は未だ不明である。本研究ではこれまで、侵入素過程のin vitro無細胞解析系樹立を試み、良好な成績を得てきた。他方、培養細胞感染系でも飛梅・AikenらがFRET法による解析系を近年報告した。そこで本年度は、FRET法によるCD4細胞へのHIV(Nef+/-)侵入を解析した。その結果、①βラクタマーゼのパッケージでHIVはNef+/-に依る感染性強/弱の性質に影響を受けず、②蛍光色素複合体をバルスしたCD4細胞はβラクタマーゼHIV吸着後1～4時間の侵入期間内に緑→青への蛍光シフトを生じ、③吸着・膜融合過程にはNef+/-の差が認められず、④侵入過程をバイパスしたVSV-G/HIVの逆転写以降はNef+/-で同等であった。これらの事から、吸着/融合以降・逆転写前、即ち、脱殻過程に何らかの侵入拘束因子の介在が示唆された。

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。しかし、侵入の分子機構は未だ不明である。そこで昨年度まで、HIV侵入過程を近似できる無細胞系の確立を試み、精製HIVと精製細胞膜画分との反応でピリオン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系を確立してきた。他方、培養細胞感染系においても、飛梅・AikenらがFRET法による侵入素過程解析系を最近報告した。両解析法を組み合わせれば侵入機構の解明に迫れるものと考えられる。そこで本年度は、感染初期に大きな差を示すことが知られているNef+/-のHIVを用いて、CD4細胞への侵入効率をFRET法で解析した。

B.研究方法

FRET法に用いる検出用HIVはVpr-β-Lactamase(BlaM)発現プラスミドと感染性HIV(Nef+/-)クローンの共導入で調整した。偽HIVピリオンの調整にはVSV-G発現ベクターを用いた。FRET法は、MT4

又はHeLa-CD4細胞の培養液にヘテロ蛍光色素2量体CCF4-AMを添加して取込ませ、検出用BlaM-HIVを感染させた。1～4時間後に409nmの励起光照射で細胞から放出される520nm(緑)447nm(青)の蛍光を蛍光リーダー又はFACSで測定した。

(倫理面への配慮) 該当事項無し。

C.研究結果

(1)BlaMをピリオン内に封入しても検出用HIVの感染性が保持されている事をp24発現細胞数のFACS解析で確認した。次に、感染性に及ぼすNef+/-の差も影響を受けない事を感染細胞数測定により確認した。
(2)感染第1ステップの吸着効率を検討した。4℃で吸着後未吸着HIVを洗浄し、37℃にシフトして感染を開始させた。sCD4を120分まで経時的に添加し、sCD4の影響を受けない12時間後添加群の感染細胞数との比を解析した結果、Nef+と-のHIVに全く差が無いことから、両HIVの吸着効率は同等である事が示された。

(3)吸着後の融合効率を感染ウイルス量或は感染後の時間を変数に、緑→青への蛍光シフト細胞数を指標に検討した。その結果、融合効率もNef+と-のHIVで差の無い事が明らかになった。

(4)VSV-G HIVを用いてCD4/coreceptorを介した侵入過程をバイパスさせると、Nef欠損HIVの感染性低下が観察されなくなり、感染細胞数はNef+のVSV-G HIVと同等であった。

D.考察

HIV感染は吸着・膜融合・脱殻から開始する。本年度この細胞侵入過程を、検出用ウイルスにBlaM封入HIVを用いたFRET法で検討した結果、感染性に大きな差のあるNef+と-のHIVで、吸着効率・膜融合効率に差の無い事が示された。しかも、特異的細胞侵入過程をVSV-Gでバイパスさせた場合には、逆転写以降の過程にNef+と-の影響が認められなかった。これらのことは、膜融合から逆転写までの間、即ち、脱殻過程にNef+と-の違いを生み出すメカニズムの存在を示唆している。

最近の報告では、HIV/SIVの侵入過程に、CREM5 α 等何らかの拘束因子の介在が示唆されている。膜融合後coreの細胞質への輸送やuncoatingに関わる因子など、これまで不明であったHIV侵入の新たな機序が見出される可能性もある。この点本研究では昨年度までに、HIV侵入素過程を近似できる無細胞解析系を確立してきた。本年度のFRET法と組み合わせれば、HIV侵入機序の解明に迫れるものと思われる。

E.結論

FRET法でCD4細胞へのHIV(Nef+/-)侵入を解析した結果、①BlaM封入でHIVはNef+/-に依る感染性強/弱の性質に影響を受けず、②蛍光色素複合体をパルスしたCD4細胞はBlaM-HIV吸着後1~4時間の侵入期間内に緑→青への蛍光シフトを生じ、③吸着・膜融合過程にはNef+/-の差が認められず、④侵入過程をバイパスし

たVSV-G/HIVの逆転写以降はNef+/-で同等であった。以上のことから、吸着/融合以降・逆転写前—即ち、脱殻過程—に何らかの侵入拘束因子の介在が示唆された。

F.健康危険情報：該当事項無し。

G.研究発表

1.論文発表

1) 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.* 78, 1324-1332, 2004.

2) Ueno, T., Tokunaga, K., Sawa, H., Maeda, M., Chiba, J., Kojima, A., Hasegawa, H., Shoya, Y., Sata, T., Kurata, T. and Takahashi, H.: Nucleolin and the packaging signal, ψ , promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1). *Microbiol. Immunol.* 48, 111-118, 2004.

3) Mutoh, E., Ishikawa, T., Takamizawa, A., Kurata, T., Sata, T. and Kojima, A.: Japanese encephalitis subunit vaccine composed of virus-like envelope antigen particles purified from serum-free medium of a high-producer J12#26 cell clone. *Vaccine* 22, 2599-2608, 2004.

4) Harada, T., Tatsumi, M., Takahashi, H., Sata, T., Kurata, T. and Kojima, A.: 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, 421-428, 2004.

H.知的財産権の出願・登録状況
該当事項無し。

4. HIV-1 感染におけるエズリンの関与

分担研究者： 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：細胞骨格に依存した感染受容体の集合や細胞接着因子が、HIV-1 による感染や細胞融合に関与することが報告されている。しかし、これら膜蛋白質と細胞骨格が直接的に結合している証拠はなく、それらを橋渡しするリンカー蛋白質の存在が示唆されている。そこで我々は、膜蛋白質と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質として機能することが既に知られているエズリンが HIV-1 感染に関与するかどうか解析した。エズリンの dominant negative 変異体を HIV-1 の標的細胞に導入し、HIV-1 感染感受性を測定した。その結果、HeLa 細胞ではほとんど影響が見られなかったが、293T 細胞では約 70%、TE671 細胞では約 40% に感染感受性が低下することがわかった。細胞依存性があるので、エズリンは HIV-1 に必須ではないが、効率良い感染に関与することが示された。この結果は、エズリンが新しい HIV-1 感染症の治療標的となりえることを示唆している。

A. 研究目的

HIV-1 感染において、細胞骨格に依存した感染受容体の集合が重要であることが報告されている。また、ICAM-1 やインテグリンなどの細胞接着因子が、HIV-1 による感染や細胞融合を助けることが報告されている。これら細胞接着因子の機能は、細胞骨格に依存していることが知られている。これらの結果から、感染受容体や細胞接着因子と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質が HIV-1 感染に関与すると考えられる。しかし、そのようなリンカー蛋白質は、まだ報告されていない。

そこで我々は、膜蛋白質と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質として働くことが既に知られているエズリンの HIV-1 感染における関与を解析した。エズリンは、HIV-1 の標的細胞である T 細胞におけるシグナル伝達の場合である免疫シナプスの形成に関与していることが報告されている。免疫シナプスとは細胞膜のラフトドメインに相当し、HIV-1 感染においてラフトが重要であることは既に知られており、エズリンが HIV-1 感染に関与する可能性は高い。

B. 研究方法

C 末端に VSV-G タグが結合したエズリンの dominant negative 変異体発現レトロウイルスベクターを HeLa/CD4 細胞、TE671 細胞、TE671/CD4 細胞、293T 細胞に接種

し、ピュロマイシンにより選択した。ピュロマイシン耐性細胞プールを以下の実験に使用した。

CXCR4-tropic HIV-1 mNDK の Env 蛋白質を持つ HIV-1 ベクターをこれらの細胞に感染させ、感染感受性をリポーター遺伝子 LacZ の活性により評価した。この HIV-1 ベクターは CD4-negative 細胞においては CD4-independent 感染を示し、CD4-positive 細胞においては CD4-dependent 感染を示す。

C. 研究結果

本研究において HIV-1 ベクター感染の標的細胞として使用した HeLa 細胞、TE671 細胞、293T 細胞におけるエズリンの発現をウエスタンブロッティングにより確認した。いずれの細胞もエズリンを発現していた (Fig.1)。

C 末端に VSV-G タグが結合したエズリンの dominant negative 変異体を HeLa/CD4 細胞、TE671 細胞、TE671/CD4 細胞、293T 細胞に導入した。これらの細胞におけるエズリン dominant negative 変異体の発現は、抗 VSV-G 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより確認した (Fig.1)。

HeLa/CD4 細胞における HIV-1 ベクターの感染性は、エズリン dominant negative 変異体により影響を受けなかった。293T 細胞における HIV-1 ベクターの感染性は、約 70% に低下した。TE671 細胞および

TE671/CD4 細胞における HIV-1 ベクターの感染性は、約 40% に低下した (Fig. 2)。しかし、VSV-G を持つ HIV-1 ベクターの感染性はほとんど影響を受けなかった。

CD4、CXCR4 の細胞表面発現を FACS により解析したが、エズリン dominant negative 変異体によって影響を受けなかった。

D. 考察

これらの結果は、TE671 細胞における HIV-1 感染においてエズリンが関与していることを示している。CD4 の細胞内領域にエズリン結合ドメインが存在するが、CD4-independent 感染も CD4-dependent 感染も同様に抑制されたので、HIV-1 感染において、エズリンが CD4 のみに作用しているのではないことを示している。

TE671 細胞においてエズリンの dominant negative 変異体は HIV-1 感染を有意に抑制したが、HeLa 細胞や 293T 細胞において大きな影響は観察されなかった。よって、エズリンは HIV-1 感染に必須ではないが、効率良い HIV-1 感染を起こすのに関与していると考えられる。

ICAM-1 は HIV-1 の感染に必須ではないが、HIV-1 感染を助けることが知られている。ICAM-1 の機能発現のためには ICAM-1 の細胞内領域にエズリンが結合することが必要である。これらのことから、エズリンの dominant negative 変異体は、ICAM-1 の機能を抑制することによって HIV-1 感染を阻害したのかもしれない。

E. 結論

エズリンは HIV-1 感染に必須ではないが、効率良い HIV-1 感染を起こすのに関与していると考えられる。エズリンが、HIV-1 感染に関与している報告はまだない。エズリンが、HIV-1 感染症の新しい治療標的となりえる可能性を示唆する。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) M. Katane, R. Fujita, E. Takao, Y. Kubo, Y. Aoki, and H. Amanuma. 2004. An essential role for the His-8 residue of the SDF-1 α -chimeric, tropism-redirecled Env protein of the Moloney murine leukemia virus in regulating postbinding fusion events. *J. Gene Med.* 6: 260-267.
- (2) Y. Kubo, A. Ishimoto, T. Ono, H. Yoshii, C. Tominaga, C. Mitani, H. Amanuma, and N. Yamamoto. 2004. Determinant for the inhibition of ecotropic murine leukemia virus infection by N-linked glycosylation of the rat receptor. *Virology* 330: 82-91.
- (3) Y. Kubo, A. Ishimoto, H. Amanuma, and N. Yamamoto. 2004. Control of membrane fusion activity by the C-terminal tail of retroviral envelope glycoproteins. *Rec. Res. Devel. Virol.* 6: 1-12 (Review).

2. 学会発表

- (1) 久保嘉直、吉居廣朗、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹：CD4 非依存性 HIV-1 感染におけるラフトの役割。第 52 回日本ウイルス学会、2004 年、横浜。
- (2) H. Yoshii, A. Ishimoto, T. Ono, C. Tominaga, C. Mitani, H. Amanuma, N. Yamamoto, and Y. Kubo: Determinant for the inhibition of ecotropic murine leukemia virus infection by N-linked glycosylation of the rat receptor. International Workshop on Retroviral Pathogenesis, 2004, Montreal, Canada.

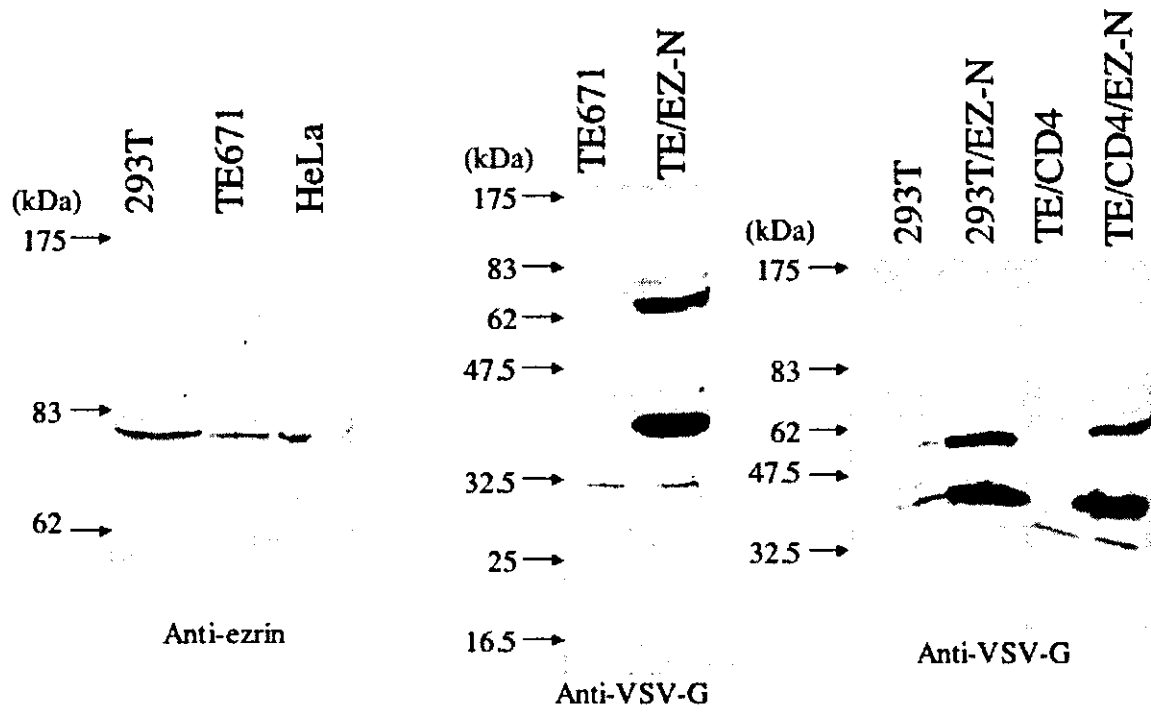


Fig. 1 内在性エズリンとエズリン dominant negative 変異体の発現

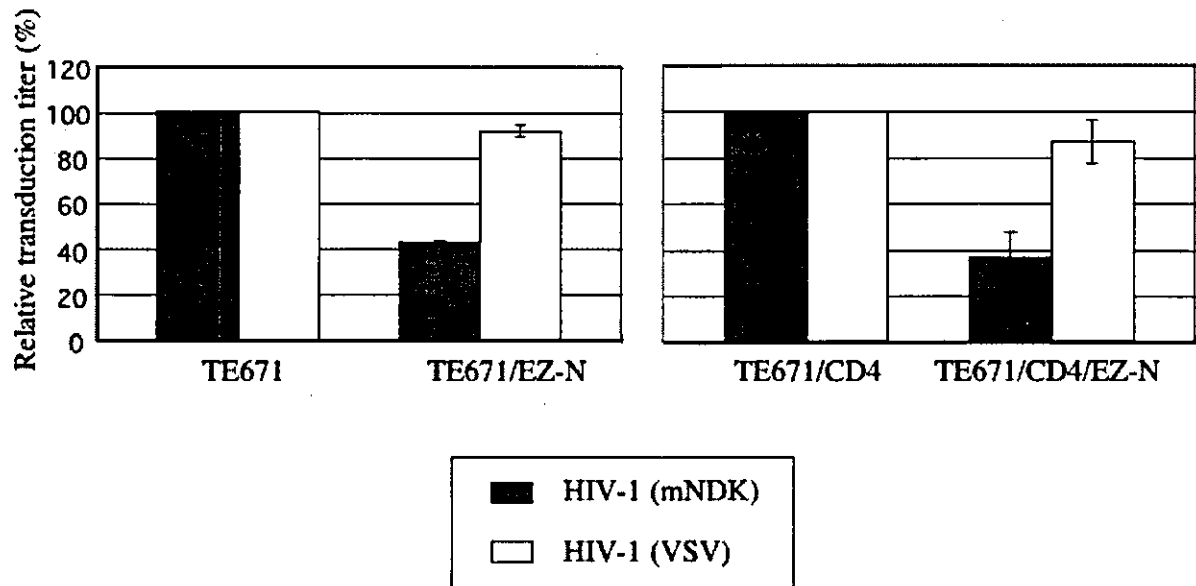


Fig. 2 エズリン dominant negative 変異体による HIV-1 感染の抑制

5. HIV-1 複製初期過程制御：Vpr 結合因子の検索

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 のみ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の核移行能と、Vprとimportin α 及び β との結合能との相関性を、典型的な核移行を示すSV-40 NLSと比較した。in vitro核移行解析とimportin α 及び β との結合をGST-pull down assayで解析した結果、Vprはimportin β の量依存的に核移行能が抑制され、同時にimportin α との結合が失われる競合阻害が認められた。次に、 α 側のimportin β binding domainを欠失した変異体 Δ IBB importin α を用いて同様の解析を行った結果、Vprは Δ IBB importin α と結合し核移行したが、予想に反して、importin β はその過程とVprの核膜への局在をも阻害した。以上の結果から、Vprの核移行にはimportin α との結合と核膜局在が必要であることが明らかとなった。また、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後、蛍光バイオイメージング解析を行なうと、Vprは生細胞内においても核移行を示したが、importin α との結合および核膜局在を失ったVpr変異体は、核移行能を完全に消失していた。更に、これらのVpr変異体を有するHIV-1は最終分化マクロファージへの感染効率が著しく減少した。以上の結果から、マクロファージへの感染はVprの核移行および核膜局在を消失するだけで、阻止できることが示唆された。

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。

これまでに、一般的な核移行配列 NLS や M9 を有するタンパク質が importin α β , Transportin を介し核移行するのに対し、Vpr は importin α のみで核移行することを示してきた。そこで本研究では、Vpr の核移行が完全に importin α のみで β を必要としない機序を証明し、これがマ

クロファージ細胞内でも行われている事、更に感染課程での重要性について解析した。

B. 研究方法

- 1) 蛋白質の精製：組換え型 Importin α 及び β 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。また、SV40-NLS は 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 細胞と Vpr, SV40-NLS の精製蛋白と細胞由来の細胞質画分を用いて行った。
- 3) pull-down assay：Vpr 及び SV40-NLS と importin α 及び β との結合を解析した
- 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) Immunodepletion 試験：細胞由来の細胞抽出液から、抗 Rchl 抗体を用いた免疫沈降法で importin α を吸収し、Western blot 法を行った。
- 5) Western blot 法：タンパク質発現を抗 Rchl 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: 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。各々のウイルス量をp24値で揃えて、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の核移行における importin β の役割

Vprの核移行能と、Vprとimportin α 及び β との結合能との相関性を、典型的な核移行を示すSV-40 NLSと比較した。その結果、Vprはimportin β の量依存的に核移行能が抑制され、同時にimportin α との結合が失われる競合阻害が認められた(図1)。この結果はSV-40 NLSとは異なり、Vprがimportin α 単独で促進される核移行機序を有する事を示している。即ち、Vprはimportin α との結合を介して核移行するが、importin β がある一定量以上存在すると、 β がimportin α と結合してVprとの結合を奪うため、Vprとimportin α との結合が弱くなる事が明らかとなった。

次に、 α 側のimportin β binding domain (IBBドメイン)を欠失した変異体 Δ IBB importin α を用いて同様の解析を行った。Vprは Δ IBB importin α と結合し、野生型importin α で観察されたようなimportin β の量依存的な結合の阻害は認められなかった。核移行解析では、予想と反して、importin β とは結合するはずのない Δ IBB importin α でVprの核移行が β により阻害された。一方、NLSの核移行は認められなかった。一つの細胞を拡大して断片の蛍光強度でVprの局在を解析すると、Vprに特徴的な核膜局在はimportin β の量存在的に阻害された。この結果から、importin β はVprの核膜への局在を阻害する可能性が考えられた。

2) 蛍光イメージング解析

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ことによって蛍光バイオイメージング解析を行った。マイクロインジェクション後約1分でVprは生細胞内で核移行したが、importin α との結合を失った変異体、核膜局在を失った変異体、その両方を失った変異体は全く核移行しなかった。従って、Vprの核移行はimportin α との結合と、核膜への局在のいずれかを失うことで阻害できることが示唆された(図3)。

3) importin α のimmunodepletion解析

Vprの核移行は、importin α の発現量が高いマクロファージ由来の細胞質画分を用いた核移行解析で認められた。そこで、Vprの核移行にimportin α が必須か否かを解析した。importin α の主要な3つのisoformを認識する抗体を用いて、マクロファージ由来の細胞質画分からimportin α をimmunodepletionした。その結果、Vprの核移行はimportin α の存在量が減少した細胞質画分で著しく減少した。

4) 最終分化マクロファージの感染実験

importin α との結合及び核膜局在を失ったvpr変異体をマクロファージ指向性感染性DNAクローンpNF462のvpr遺伝子に組み換えたウイルスを最終分化マクロファージに感染させ、ウイルス量の変化を測定した。これらのVpr変異体を有するHIV-1はマクロファージへの感染効率が著しく減少した(図4)。

D. 考察

Vprの核移行にimportin α/β の結合が必要ないと言う事、およびimportin α のみとの結合こそが必須であることが立証された。その事実はVprとimportin α の結合を標的とした新規抗HIV-1薬の開発が可能である事を示唆している。

E. 結論

Vprの核移行には、importin α との結合と核膜局在が必要であることが示唆された。また、importin α の結合あるいは核膜局在の片方でも失ったVpr変異HIV-1はマクロファージ感染効率が著しく低下する事から、マクロファージへの感染はVprの核移行および核膜局在を消失するだけで、阻止できることが示唆された。

F. 研究危険情報 該当事項なし。