

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

1. Takahashi M., Tajima S., Takeshima SN, Konnai S., Yin SA., Okada K., Davis WC. and Aida Y.: Ex vivo survival of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5- B cells that express BLV, *Microbes and Infection*, 6:584-595, 2004.
2. Iijima S., Nitahara-Kasahara Y., Kimata Y., Isogai M, Miwa M., Yokota-Tsunetsugu Y., and Aida Y.: Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4<sup>+</sup> T cells, *Virology*, 327:249-261, 2004
3. Yamanishi K., Pichl L., Nitahara-Kasahara Y., and Aida Y.: Three dimensional space interaction model for HIV-1 accessory protein Vpr and membrane lipid molecules. *J. Three Dimensional Images*, 18:67, 2004.
4. Kamata M., Nitahara-Kasahara Y., Miyamoto M., Yoneda Y., and Aida Y.: mportin- $\alpha$  promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr, *J. Virol.*, in press.
5. Takahashi M., Tajima S., Okada K., Davis WC, and Aida Y.: Involvement of Bovine Leukemia Virus Tax in Induction and Inhibition of Apoptosis. *Microbes and Infection*, in press.
6. Kuramitsu M., Hashizume C., Yamamoto N., Azuma A., Kamata M., Yamamoto N., Tanaka Y., and Aida Y.: A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA, *J. Virol.*, in press.

### 2) 学会発表

1. 倉光球, 橋爪智恵子, 間陽子: “HIV-1 Vpr による pre-mRNA スプライシング反応阻害の解析”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 11 月, (2004)
2. 笠原 (仁田原) 優子, 飯島沙幸, 横田恭子, 間陽子: “importin  $\alpha$  により促進される Vpr 核移行機序の HIV-1 標的細胞を用いた解析”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 11 月, (2004)
3. 橋爪智恵子, 鈴木辰徳, 倉光球, 間陽子: “HIV-1 Vpr と Spliceosome-associated protein(SAP)145 との結合を介して発揮される スプライシング反応の阻害機

構”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 11 月, (2004)

4. 木全清典, 倉光球, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: “Vpr によって変化する HIV-1 mRNA 量比の定量解析”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 11 月, (2004)
  5. 松田剛, 間陽子: “HIV-1 Vpr の核移行における Importin 7 の影響について”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 11 月, (2004)
  6. 宗田光峰, 笠原 (仁田原) 優子, 橋爪智恵子, 間陽子: “HIV-1 Pre-integration complex(PIC)の構成因子の細胞内局在”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会・総会, 横浜, 11 月, (2004)
  7. 木全清典, 倉光球, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: “HIV-1 mRNA 量比に及ぼす Vpr の影響の定量解析”, 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 静岡, 12 月, (2004)
  8. 橋爪智恵子, 鈴木辰徳, 倉光球, 間陽子: “スプライソソームとの結合を介して起こる HIV-1 Vpr のスプライシング阻害反応機構の解析”, 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 静岡, 12 月, (2004)
  9. 笠原 (仁田原) 優子, 飯島沙幸, 横田恭子, 間陽子: “importin  $\alpha$  を介した Vpr 新規核移行機序の HIV-1 標的細胞を用いた解析”, 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 静岡, 12 月, (2004)
  10. Aida Y., Iijima S., Nitahara-Kasahara Y., Kimata K., Yokota Y.: “Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4<sup>+</sup>T cells” The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, September, (2004)
  11. Aida Y.: “The role of Vpr in replication of HIV-1”, International Symposium 5th AIDS Seminar in KUMAMOTO, Kumamoto, Japan, September, (2004).
- ### 3) 特許の出願
1. 特願 2004-226462 号 (HIV-1 感染を阻害する変異 Vpr タンパク質及びそれを含む医薬組成物) 発明者 間陽子, 飯島沙幸, 笠原優子, 木全清典
  2. 特願 2004-298288 号 (アポトーシス誘導物質を含む医薬組成物) 発明者 間陽子, 渡来仁, 三浦智行
  3. 特願 2004 298238 号 (リボソーム) 発明者 間陽子, 渡来仁, 河野健司

Fig. 1 VprとImp  $\alpha$  の結合を介した核移行は Imp  $\beta$  の量依存的に抑制される

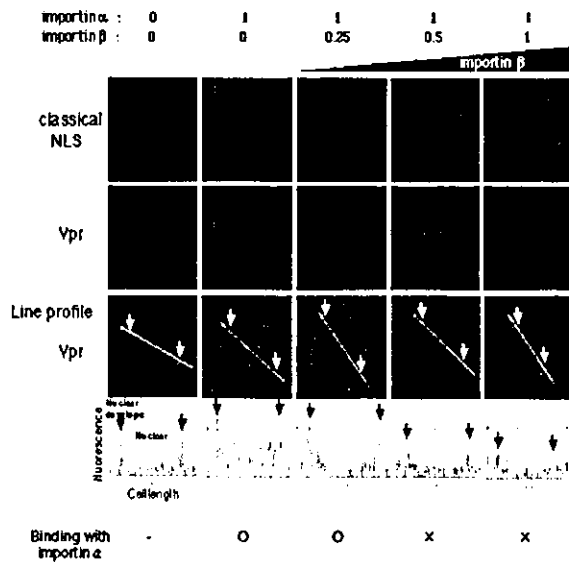


Fig.2 Vprは $\Delta$ IBB Imp  $\alpha$  と結合し核移行するが、Imp  $\beta$ はその過程だけでなくVprの核膜局在をも阻害する

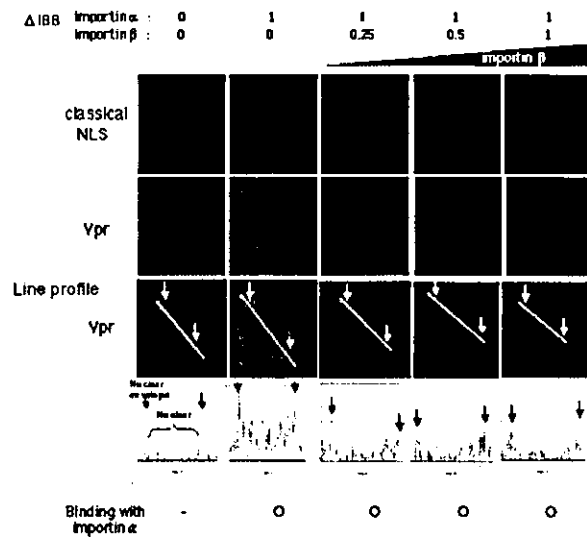


Fig.3 Vprの核移行にはImp  $\alpha$ との結合と核膜局在が必要であり、その過程はある一定量以上のImp  $\beta$ の存在によって阻害される

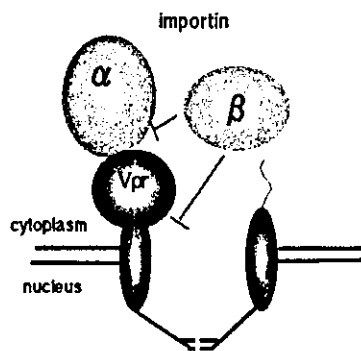
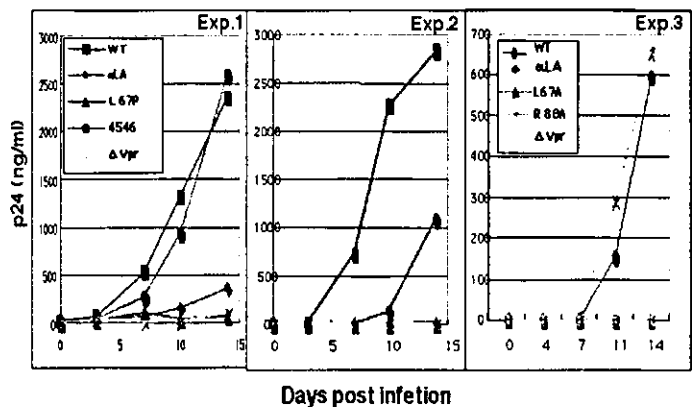


Fig.4 マクロファージへの感染はVprの核移行および核膜局在を消失するだけで、阻止される



6. HIV-1 感染初期過程におけるウイルスゲノム動態におけるインテグラーゼの機能的関与および関連宿主因子の同定

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

ウイルスゲノム (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。GST-インテグラーゼによる pull-down 法および yeast-two hybrid 法により、HIV-1 インテグラーゼに結合する宿主因子 (Rch-1, SIP-1) を同定した。こうした宿主因子の機能関与の評価のために、従来の合成 siRNA もしくは一過性発現ベクターと比べ、siRNA 導入効率および抑制効果の持続性においてすぐれている shRNA 発現レンチウイルスベクターを開発した。以上、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。また、shRNA 発現レンチウイルスベクターによる各関連宿主因子候補のウイルス複製における機能的関与を検討する実験系を確立し得た。

A. 研究目的

HIV-1 は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 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。これまでに我々を含む研究報告により、インテグラーゼ蛋白が核局在能を持つことおよび関連宿主因子の関与が示唆されている。しかしながら、実際の HIV 感染におけるウイルスゲノムの核内移行におけるこうした因子の直接的関与に関しては不明である。本研究では HIV 感染系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の明確化と関連宿主因子の同定を目的とする。

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。

2) HIV-1 複製における各変異の HIV-1 の影響： 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。

3) 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。

4) レンチウイルス shRNA 発現ベクターの構築と評価： shRNA を H1 プロモーターにより発現するレンチウイルスベクターを構築し、従来の合成 siRNA もしくは一過性発現ベクターとその抑制効果を比較した。

5) インテグラーゼと結合する宿主因子の同定： GST-インテグラーゼによる pull-down 法および yeast-two hybrid 法により、HIV-1 インテグラーゼに結合する宿主因子の同定を試みた。

(倫理面への配慮： 該当事項無し)

C. 研究結果

1) ウイルス cDNA 結合能欠損インテグラーゼ変異体の作製： 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) の欠損 ( $\Delta$ PYNP) もしくは点変異体 (N144Q, KKK>AAA) はウイルス cDNA 結合能が著しく低下することを確認した (図 1-A)。しかし、いずれの変異もインテグラーゼの核局在機能には影響しなかった (図 1-B)。

2) 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 ( $\Delta$ PYNP, N144Q, KKK>AAA) を得た (図 2)。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、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。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これらの変異体 ( $\Delta$ 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。また、インテグラーゼ酵素活性変異体 (D116G) に  $\Delta$ PYNP もしくは KKK>AAA 変異体の double-mutant D116G- $\Delta$ PYNP および D116G- KKK>AAA を作製し同様に解析したところ、2LTR の蓄積が有意に低下することを確認した (図 3)。

3) 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、 $\Delta$ PYNP および KKK>AAA 変異体は親株 (WT) と比べて ~15% 以下であった (図 4A)。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  $\Delta$ 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 (図 4B)。

4) HI プロモーターによる shRNA 発現レンチウイルスベクターの作製およびその評価をおこなったところ、従来の合成 siRNA もしくは一過性発現ベクターと比べ、siRNA 導入効率および抑制効果の持続性においてすぐれていることを示した。

5) インテグラーゼと結合する宿主因子の同定: GST-インテグラーゼによる pull-down 法および yeast-two hybrid 法により、HIV-1 インテグラーゼに結合する宿主因子 (Rch-1, SIP-1) を同定した。

#### 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となるものと考えられる。

#### E. 結論

1. インテグラーゼが HIV-1 感染初期過程における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。

2. 従来の合成 siRNA もしくは一過性発現ベクターと比べ、siRNA 導入効率および抑制効果の持続性においてすぐれている shRNA 発現レンチウイルスベクターを開発した。

3. HIV-1 インテグラーゼに結合するいくつかの宿主因子候補 (Rch-1, SIP-1) を同定した。

#### F. 研究発表

[2004 年度 論文発表]

1. Kurihara, K., N. Harashima, S. Hanabuchi, M. Masuda, A. Utsunomiya, R. Tanosaki, M. Tomonaga, T. Ohashi, A. Hasegawa, T. Masuda, J. Okamura, Y. Tanaka, and M. Kannagi. Potential immunogenicity of adult T cell leukemia cells in vivo. *Int J Cancer* (in press).

2. 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 Nuclear Import of Viral cDNA during Acute Infection. *J. Virol.* 78:11563-73, 2004.

3. Emori, Y., T. Ikeda, T. Ohashi, T. Masuda, T. Kurimoto, M. Takei, and M. Kannagi. Inhibition of human immunodeficiency virus

type 1 replication by Z-100, an immuno modulator extracted from human-type tubercle bacilli, in macrophages. *J Gen Virol* **85**: 2603 - 13, 2004.

4. Zhou, X., M. Kubo, H. Nishitsuji, K. Kurihara, T. Ikeda, T. Ohashi, M. Azuma, T. Masuda, and M. Kannagi. Inducible-costimulator -mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in CD4(+) T lymphocytes. *Virology* **325**:252-63, 2004.

5. Nomura, M., T. Ohashi, K. Nishikawa, H. Nishitsuji, K. Kurihara, A. Hasegawa, R. A. Furuta, J. Fujisawa, Y. Tanaka, S. Hanabuchi, N. Harashima, T. Masuda, and M. Kannagi. Repression of tax expression is associated both with resistance of human T-cell leukemia virus type 1-infected T cells to killing by tax-specific cytotoxic T lymphocytes and with impaired tumorigenicity in a rat model. *J Virol* **78**:3827-36, 2004.

6. Nishitsuji, H., T. Ikeda, H. Miyoshi, T. Ohashi, M. Kannagi, and T. Masuda. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes Infect* **6**:76-85, 2004.

7. Harashima, N., K. Kurihara, A. Utsunomiya, R. Tanosaki, S. Hanabuchi, M. Masuda, T. Ohashi, F. Fukui, A. Hasegawa, T. Masuda, Y. Takaue, J. Okamura, and M. Kannagi. Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res* **64**:391-9, 2004.

[2004年度 学会発表]

1) 増田貴夫,池田たま子, 西辻裕紀,濱本誠二,神奈木真理 : HIV-1 ゲノムの核内移行におけるインテグラーゼおよび宿主因子の機能的関与。第52回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2004.

2) 西辻裕紀, 神奈木真理, 増田貴夫 : インテグラーゼおよび Tat を標的とした shRNA 発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製抑制と逃避変異体出現の解析。第52回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2004.

3) 濱本誠二,西辻裕紀,天笠光雄,神奈木真理, 増田貴夫 : HIV-1 インテグラーゼと相互

作用する宿主細胞内因子の同定。第52回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2004.

4) 久保誠, 西辻裕紀, 栗原清, 増田貴夫,神奈木真理 : HIV-1 抗原と無関係な特異性を持つ CTL 株とその培養上清による HIV-1 複製抑制。第52回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2004.

5) 周シン, 久保誠, 西辻裕紀, 栗原清, 池田たま子, 大橋貴, 東みゆき, 増田貴夫, 神奈木真理 : ICOS リガンドによる HIV-1 複製抑制。第52回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2004.

6) 小森一哉, 長谷川温彦, 栗原清, 原嶋奈々江, 大橋貴, 増田貴夫, 神奈木真理 : HTLV-1 経口感染ラットにおける免疫不応答とその機序。第52回日本ウイルス学会学術集会(横浜)2004.

7) 池田たま子, 西辻裕紀,濱本誠二,神奈木真理, 増田貴夫 : HIV-1 ゲノムの核内移行におけるインテグラーゼおよび宿主因子の機能的関与。第18回日本エイズ学会学術集会(静岡)2004.

8) 西辻裕紀, 神奈木真理, 増田貴夫 : インテグラーゼおよび Tat を標的とした shRNA 発現レンチウイルスベクターによる HIV-1 複製抑制と逃避変異体出現の解析。第18回日本エイズ学会学術集会(静岡)2004.

9) 濱本誠二,西辻裕紀,天笠光雄,神奈木真理, 増田貴夫 : HIV-1 インテグラーゼと相互作用する宿主細胞内因子の同定。第18回日本エイズ学会学術集会(静岡)2004.

10) 周シン, 久保誠, 西辻裕紀, 栗原清, 池田たま子, 大橋貴, 東みゆき, 増田貴夫, 神奈木真理 : ICOS と CD28 を介する HIV-1 複製調節。第18回日本エイズ学会学術集会(静岡)2004.

11) 久保誠, 西辻裕紀, 栗原清, 増田貴夫, 神奈木真理 : HIV-1 抑制因子を産生する健常人由来 CD8+CTL 株の樹立。第18回日本エイズ学会学術集会(静岡)2004.

12) 野村祐介, 増田貴夫, 河合剛太 : 1形のみを形成する HIV-1 インテグラーゼ Zn フィンガードメイン変異体の構造解析。第27回日本分子生物学会(神戸)2004.

13) 増田貴夫 : ウイルスゲノムの宿主染色体への組み込み機構—感染成立にむけたウ

イルスゲノム動態—第 15 回フォーラム・イン・ドージン “ウイルス-飛び回る遺伝子-の分子病理学 (熊本) 2004.

G. 知的所有権の出願・取得状況  
無し

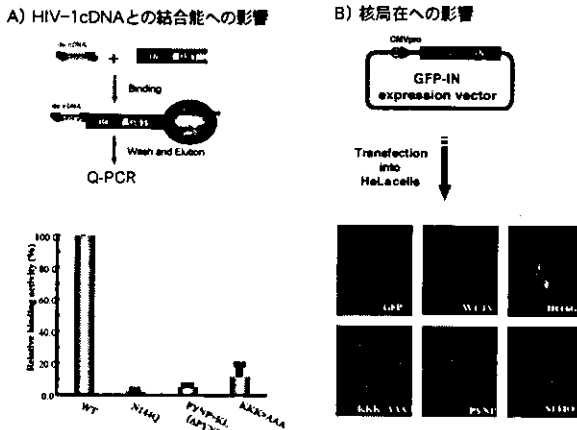


図 1 IN 変異体の性状解析

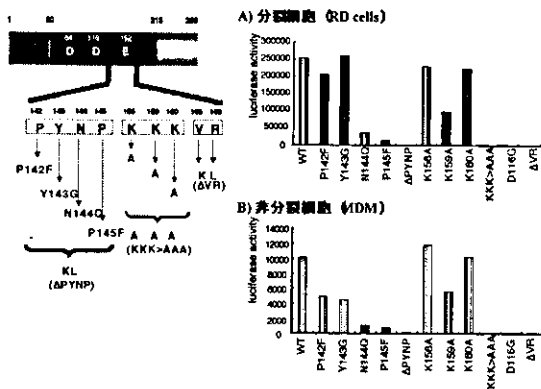


図 2 IN 変異 HIV の感染性

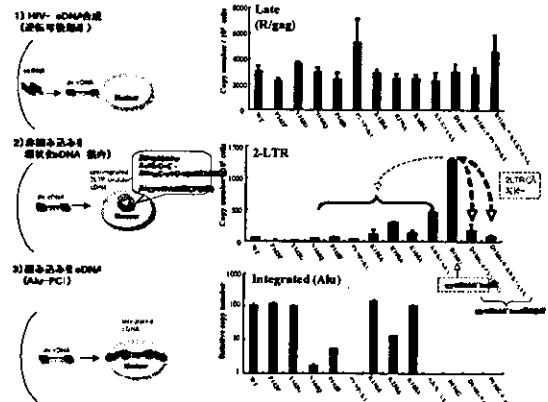


図 3 IN 変異 HIV の感染初期過程ウイルスゲノム動態

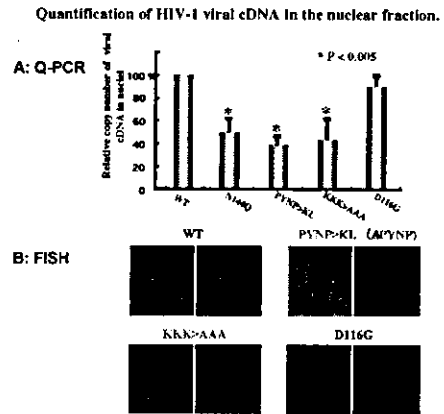


図 4 IN 変異 HIV の感染初期過程ウイルスゲノムの細胞内局在

## 7. T細胞サブセットと HIV-1 トロピズム

**研究要旨** AIDS の病態進行とともに、HIV-1 感染者の CD38+ T 細胞の割合が増加することが知られている。私達は、これまでに、健常者の PBMC に由来する CD4+ T 細胞を CD38 サブセットに分画し、HIV-1 トロピズムについて検討した結果、CD38+分画が X4 HIV-1 に IL-4 依存的に高感受性を示すこと、両サブセット間で X4 HIV-1 の吸着、進入、インテグレーション過程には大きな違いは見られないこと、転写因子である AP-1 が IL-4 依存的に CD38+サブセットにおいて活性化されていることを報告してきた。そこで、両サブセットについて GeneChip 解析を行ったところ、IL-4 処理 CD38+サブセットで認められ、IL-4 未処理 CD38+サブセットと IL-4 処理 CD38-サブセットで認められないものとして約 20 遺伝子、逆に IL-4 処理 CD38-サブセットで認められ、IL-4 未処理 CD38-サブセットと IL-4 処理 CD38+サブセットで認められないものとして 4 遺伝子を同定できた。本年度は GeneChip 解析で同定した遺伝子の機能を中心に検討した。GeneChip 解析で同定した遺伝子のうち、RNF125 は、IL-4 依存的に発現が誘導され、その発現は CD38-サブセットにおいて高く、HIV-1 LTR プロモーターからの転写に抑制的に働くことが明らかになった。

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 小路早苗、李永剛

(大阪大学微生物病研究所)

### 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) が関わりと考えられる。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 感受性に関する報告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 細胞サブセットが X4 HIV-1 に高感受性を示

すことを見出した。CD4+CD38+ と CD4+CD38- サブセットの表面抗原を比較したところ、CD4、CXCR4 発現には両サブセット間で差は認められなかった。CD38+ T 細胞自らが産生する 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には両サブセット間で大きな差異が認められないことが明らかとなった。IL-4 処理及び未処理の両サブセットについて GeneChip 解析を行ったところ、IL-4 処理 CD38+サブセットでのみ認められたものとして 20 遺伝子、IL-4 処理 CD38-サブセットでのみ認められたものとして 4 遺伝子を同定することができた。そこで、本年度は、GeneChip 解析で同定した遺伝子に絞って解析を行った。

### 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、IL-4 または PHA 存在下で 3 日間培養を行った。培養後、total RNA を回収し、半定量的 RT-PCR 法を行い、サブセット間の遺伝子発現を比較した。

HIV-1 LTR プロモーターに与える影響については、HIV-1 LTR の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子と RNF125 発現プラスミドを cotransfect し、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。

HIV-1 タンパク質産生に与える影響については、HIV-1 proviral DNA (pNL4-3) と RNF125 発現プラスミドを cotransfect し、48 時間後に細胞上清中の HIV-1 Gag p24 抗原を ELISA 法により測定した。

変異型 RNF125 である C37A の作製には、PCR 法に基づく site-directed mutagenesis を用いた。

### C. 研究結果

1) 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。GeneChip 解析で同定した遺伝子を、半定量的 RT-PCR 法を用いてさらに発現量の比較を行った。IL-4 処理 CD38+サブセットで発現の高い遺伝子として 8 遺伝子、IL-4 処理 CD38-サブセットで発現の高い遺伝子として 3 遺伝子が確認された。IL-4 処理 CD38-サブセットで発現の高い遺伝子の 1 つ、RNF125 についてさらに詳細な解析を行った。

2) CD4+ T細胞を IL-4 で 3 日間刺激したところ、RNF125 の発現が誘導された。一方、IL-4 の代わりに PHA で 3 日間処理した場合には、RNF125 の発現は誘導されなかった。

3) CD4+CD38+および CD4+CD38- T細胞サブセットを IL-4 で 3 日間刺激したところ、CD38+に比べ CD38- T細胞サブセットにおいて、より高い RNF125 の発現が見出された。

4) RNF125 は GeneChip 解析により CD38- T細胞サブセット (X4 HIV-1 に低感受性のサブセット) で認められた遺伝子の 1 つである。HIV-1 LTR からの転写への影響をルシフェラーゼアッセイ法により検討したところ、RNF125 の用量依存的に HIV-1 LTR からの転写が抑制された。これはヒト付着細胞 293T とヒト T細胞株 Jurkat の両方において観察された。

5) RNF125 はそのアミノ酸配列から RING domain を持つことから、タンパク質のユビキチン化に関わる E3 ligase であることが推定される。RING domain の最初のシステインをアラニンに置換することで、E3 ligase 活性を欠失した変異体を作製できることがこれまでに報告されている。この変異体 (C37A) を用いてルシフェラーゼアッセイ法を行ったところ、C37A は HIV-1 LTR からの転写を抑制しなかった。

6) さらに、HIV-1 のウイルスタンパク質産生に与える影響を検討した。HIV-1 proviral DNA と RNF125 を cotransfect したところ、細胞上清中に放出される Gag p24 量が RNF125 の用量依存的に抑制された。



#### D. 考察

CD4+CD38+サブセットは、CD4+CD38-サブセットに比べて X4 HIV-1 に高感受性である。この高感受性には、HIV-1 のレセプターおよびコレセプターの発現に関わるウイルス吸着・侵入段階の促進ではなく、逆転写過程も関わっておらず、その後の転写過程の亢進に基づいていると考えられた。GeneChip 法で同定した CD4+CD38-サブセット特異的遺伝子産物は、X4 HIV-1 の転写に抑制的に働くことが考えられた。その遺伝子産物の1つである RNF125 は、HIV-1 LTR プロモーターからの転写を抑制し、その抑制活性には RNF125 の RING domain が重要であった。このことから、RNF125 は HIV-1 LTR プロモーターに作用する様々な転写因子、もしくは、その転写因子のシグナル経路に関わる宿主因子をユビキチン化することによって、HIV-1 LTR からの転写を間接的に阻害していることが示唆された。RNF125 の抑制機序を明らかにすることは、X4 HIV-1 複製に関わる宿主因子のさらなる解明につながるばかりではなく、HIV-1 の複製抑制に機能する治療薬開発への道が拓けると考えられる。

GeneChip 解析で同定された遺伝子のうち、半定量的 RT-PCR 法によって遺伝子発現の差が確認されたものについては、RNF125 同様、HIV-1 の転写に影響を与える可能性が高い。これらの遺伝子についても HIV-1 との関わりを今後詳細に検討することによって、HIV-1 複製遮断法の開発に繋げて行きたい。

#### E. 結論

HIV-1 感染の標的である 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 (AP-1 など) を誘導した。一方、CD38-サブセット

は同じ IL-4 刺激によって、CD38+で誘導されるような転写亢進を妨げる因子として RNF125 が誘導された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kinomoto, M., Yokoyama, M., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Sata, T., and Tokunaga, K. Amino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J. Virol.*, in press.

Isarangkura, P.N.A., Li, G.M., Warachit, J., Iwabu, Y., Tsuji, S., Auwanit, W., Yamamoto, D., Goto, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Ikuta, K. Different susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to Env gp41-derived synthetic peptides corresponding to the two heptad repeat regions. *Microbes Infect.*, in press.

Komoto, S., Tsuji, S., Lee, B.J., Iwabu, Y., Kojima, Y., Otake, T., Taniguchi, K., and Ikuta, K. Higher frequency of premature stop codon mutations at *vpu* gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01\_AE compared with that of other subtypes. *Microbes Infect.*, in press.

Li YG, Iwabu Y, Warachit J, Kinomoto M, Ibrahim MS, Tsuji S, Mukai T, Kameoka

M, Tokunaga K, Sata T, and Ikuta K. Interleukin-4 upregulates T-tropic human immunodeficiency virus type 1 transcription in primary CD4<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> T-lymphocyte subset. *Microbiol. Immunol.*, in press.

Kinomoto, M., Mukai, T., Li, Y.G., Iwabu, Y., Warachit, J., Palacios, J.A., Ibrahim, M.S., Tsuji, S., Goto, T., and Ikuta, K. Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by replacing the region including Env derived from defective particles with an ability to form particle-mediated syncytia in CD4<sup>+</sup> T cells. *Microbes Infect.* 6: 911-918, 2004.

Kameoka, M., Nukuzuma, S., Itaya, A., Tanaka, Y., Ota, K., Ikuta, K., and Yoshihara, K. RNA interference directed against poly(ADP-Ribose) polymerase 1 efficiently suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells. *J. Virol.* 78: 8931-8934, 2004.

## 2. 学会発表

岩部幸枝、Jiranan Warachit、李桂梅、李永剛、小路早苗、辻祥太郎、生田和良. HIV-1 サブタイプ B 型に持続感染した細胞への HIV-1 重感染. 第 52 回日本ウイルス学会. 2004.

Jiranan Warachit、李永剛、岩部幸枝、李桂梅、Madiha S Ibrahim、小路早苗、辻

祥太郎、小島洋子、大竹徹、河本聡史、谷口孝喜、生田和良. HIV-1 臨床分離株 B 型と AE 型間におけるウイルス学的性状の比較. 第 52 回日本ウイルス学会. 2004.

小路早苗、岩部幸枝、Jiranan Warachit、李永剛、李桂梅、生田和良. CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> T 細胞トロピック HIV-1 高感受性に関わる宿主因子の検索. 第 18 回日本エイズ学会. 2004.

李永剛、亀岡正典、岩部幸枝、Jiranan Warachit、李桂梅、Madiha S Ibrahim、小路早苗、辻祥太郎、生田和良. 正常 CD4<sup>+</sup> T 細胞において IL-4 依存的に誘導される AP-1 による X4 HIV-1 複製亢進. 第 18 回日本エイズ学会. 2004.

李桂梅、岩部幸枝、Jiranan Warachit、李永剛、Madiha S Ibrahim、小路早苗、辻祥太郎、後藤俊幸、山本大助、林良雄、木曾良明、生田和良. HIV-1 Env gp41 の heptad repeat ペプチド(C34)の HIV-1 サブタイプ間の比較. 第 18 回日本エイズ学会. 2004.

## 8. HIV-1 Gag 蛋白の細胞質内輸送経路の解析

分担研究者 森川裕子（北里大学 生命科学研究所）

### 研究要旨

昨年度、酵母遺伝変異株を用いた網羅的解析で、HIV-1 Gag蛋白の細胞内輸送の責任宿主因子をいくつか見いだした。これらが真の宿主因子かを検証する目的で、本年はこれらのヒトホモログ、すなわち、Syntaxin6/16（初期エンドソーム/TGNに分布）及びSyntaxin12（後期エンドソームに分布）とHIV-1のover-expression実験を293T細胞で行った。1）いずれのsyntaxinもfull-sizeのconstructは粒子産生を阻害しなかったが、産生されたウイルス粒子中にはそれらが取り込まれていた。2）C末端半分のconstructを発現させると、そのsyntaxin constructは核周辺領域に局在し、Gag蛋白をrecruitして粒子産生を阻害した。こうしたものではそのsyntaxinはウイルス粒子に取り込まれなかった。逆に、ウイルス粒子に取り込まれたものは、粒子産生を阻害しなかった。3）N末端半分のconstructでは、syntaxinの膜貫通領域を欠くため特定の局在性を失い、Gag蛋白及びsyntaxin constructのいずれも細胞質にbroadに分布した。粒子産生量に変化はなく、また、ウイルス粒子にも取り込まれなかった。

### A. 研究目的

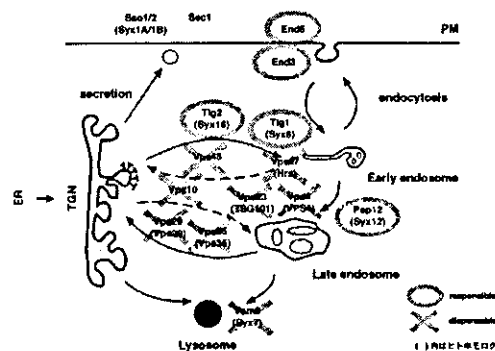
HIVの主構造蛋白であるGag蛋白は、cytosolでの蛋白合成後、膜にtargetingし、多量体形成によりGag粒子を形成して出芽する。近年、このGag蛋白の細胞内輸送や粒子出芽にエンドソーム経路の関与が示唆されている。

我々は昨年度、Gag蛋白の細胞内輸送経路の概要を把握する目的で、酵母さいぼうのエンドソーム輸送蛋白質群（target membraneに存在し小胞膜輸送に関与するsyntaxin群、後期エンドソームの輸送蛋白質Vps群、形質膜でのエンドソーム小胞形成に関与する蛋白質群）の欠損株/変異株を用いて網羅的に解析し、1）トランスゴルジネットワーク（TGN）及び初期/後期エンドソームのsyntaxinはGag蛋白の細胞内輸送に必要であるものの、その下流に位置するリソソームsyntaxinは不要であること、2）後期エンドソームの輸送蛋白質Vps群（Gag L domain結合因子として単離されたTSG101のホモログやESCRT component及び後期エンドソームとTGNのshuttlingに関与する蛋白質群）は不要であること、これに対し、3）形質膜からのエンドソーム小胞形成及びその輸送に関与する蛋白質群は必要であるとの知見を得た（図1）。

そこで本研究では、こうした酵母細胞での

責任宿主因子がHIV感染における真の宿主因子か、ヒトホモログを単離しヒト細胞での検証を開始した。

図1. Endosomal molecules responsible for intracellular transport of HIV-1 Gag in yeast



### B. 研究方法

#### 1. DNAの構築とtransfection

Gag蛋白の発現にはHIV-1 cDNAクローン（pNL43株）あるいはpol領域欠損のクローン（pNL43/PR(D25N)ΔBal）を用いた。Syntaxin6, 12, 16のcDNAはHeLa細胞cDNAライブラリよりPCR法で単離し、CMVプロモーターをもつpCMV-Tag2B vectorのFLAG-tag下流に挿入した。

これらのDNAをLipofectamine2000あるいはTransIT/LT293を用いて293T細

胞に導入した。

## 2. ウイルス粒子の精製

transfection 48 時間後の培養上清を filter でろ過し sucrose cushion を用いてウイルス粒子を精製した。

## 3. Western blot

Gag 蛋白の検出には抗 HIV-1 CA 抗体を、syntaxin の検出には抗 FLAG 抗体を用いた。

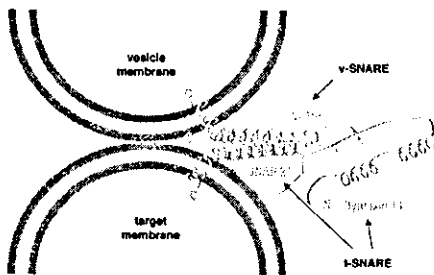
## 4. 共焦点レーザー顕微鏡での観察

transfection 48 時間に細胞を 3.7% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100 で処理した後、抗 HIV-1 CA 抗体と抗 FLAG 抗体で反応させた。

## C. 研究結果

ほぼすべての syntaxin はアミノ末端半分に2つのコイル構造を、カルボキシル末端半分に1つのコイル構造と膜貫通領域をもち、構造的に酷似する。しかしながら、その相互作用は特異的であり、vesicle membrane 上の v-SNARE と target membrane 上の syntaxin カルボキシル末端コイル構造が特異的に結合しそれぞれの膜を識別する (図 2)。

図 2. Structure of Syntaxin In SNARE complex



そこで本研究では、酵母遺伝変異株を用いた解析で見いだされた syntaxin (Tlg1, Tlg2, Pep12) のヒトホモログ、すなわち、Syntaxin6/16 (初期エンドソーム/TGN に分布) 及び Syntaxin12 (後期エンドソームに分布) をアミノ末端とカルボキシル末端半分にわけ、HIV-1 (NL43 株) と共発現させた。

## 1. ウイルス粒子の産生

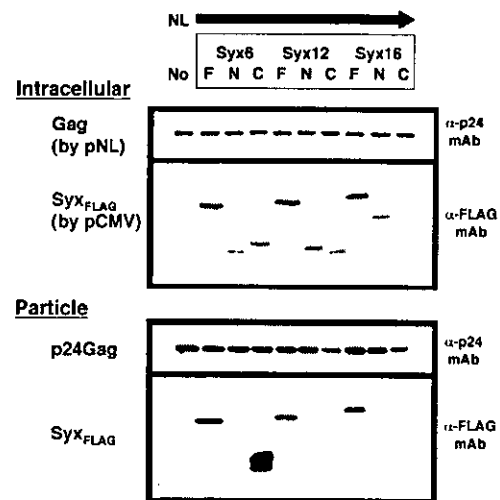
まず最初に Gag 蛋白と syntaxin construct (full-size, N 末端半分, C 末端半分) の細胞内発現を Western blot で調

べた。Gag 蛋白の発現量はほぼ一定であったが、syntaxin construct の発現量は様々であった (図 3 上)。

次に、ウイルス粒子の産生量を調べたところ、syntaxin12 及び 16 の C 末端半분을共発現させると、粒子産生量がやや減少することが判明した (図 3 下)。

産生された粒子を調べたところ、full-size の syntaxin を共発現させた場合にはいずれの syntaxin でもそれらが粒子内に取り込まれることを見いだした。また、syntaxin6 の C 末端半분을共発現させた場合にも粒子内への取り込みが認められ、その取り込み量は多かった (図 3 下)。

図 3. Virion production & incorporation (under overexpression of Syntaxin 6/12/16)

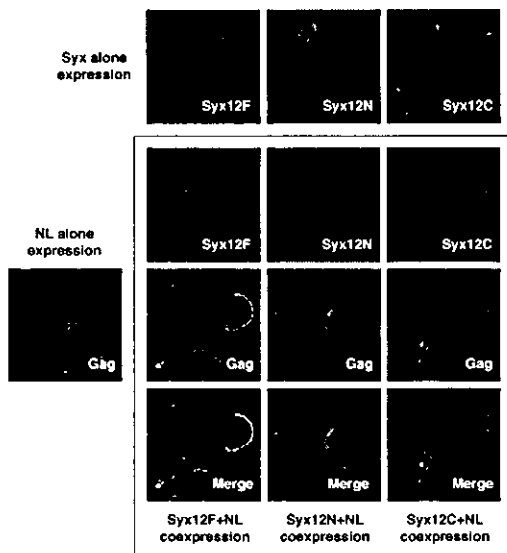


2. Gag 蛋白及び syntaxin の細胞内局在  
まず最初に NL 単独発現における Gag 蛋白の細胞内局在と syntaxin 単独発現におけるその細胞内局在を調べた。NL 単独発現細胞では Gag 蛋白は細胞質に broad に観察された (図 4 左)。一方、syntaxin 単独発現では、full-size の construct を発現させた場合には大小の細胞質内顆粒状構造物として、N 末端半분을発現させた場合には細胞質に broad に、C 末端半분을発現させた場合には核周辺領域に凝集してそれぞれの syntaxin construct が観察された。

(図 4 上)。これらの syntaxin construct を NL と共発現させると、局在の変化が観察された。例えば Syntaxin12 では、full-size の construct を共発現させると、

syntaxin の局在が細胞質内顆粒状から形質膜に変化し、その形質膜には Gag 蛋白の集積も観察された。しかしながら、N 末端半分を共発現させた場合には Gag 蛋白及び syntaxin のいずれも細胞質に broad に存在し、局在の変化はなかった。これに対し、C 末端半分を共発現させた場合には、syntaxin の局在はそのままであったが、Gag 蛋白の局在が細胞質における broad な分布から syntaxin が局在する核周辺領域に変化した (図 4)。すなわち、Syntaxin12 (full-size) +Gag の場合には Gag によって syntaxin が形質膜に recruit され、逆に、Syntaxin12 (C 末端半分) +Gag の場合には syntaxin によって Gag が核周辺領域に recruit される。これらに対し、Syntaxin12 (N 末端半分) +Gag の場合にはそれぞれ independent なまま存在すると考えられた。

図 4. Gag と Syntaxin12 の細胞内局在



#### D. 考察

いずれの syntaxin もカルボキシル末端に膜貫通領域をもつため、N 末端半分の construct では可溶性蛋白質の性状を示すと予測された。これと一致するように、N 末端半分の発現させた場合にはその syntaxin construct が細胞質に broad に分布し、full-size の construct が示すような特定の局在性を失った。一方、C 末端半分の construct では膜貫通領域が保持され

るものの、その細胞内局在は full-size のものとは異なり、Syntaxin12 や 16 では核周辺領域に凝集して観察された。こうした syntaxin construct と HIV-1 (NL) を共発現させると、N 末端半分の construct の場合には Gag 及び syntaxin のいずれも細胞内に broad に存在したままであったが、C 末端半分の construct の場合には Gag が syntaxin の局在部位に recruit される現象が観察された (図 4)。

syntaxin construct と HIV-1 (NL) の共発現細胞からのウイルス粒子産生を調べたところ、syntaxin の full-size 及び N 末端半分の construct の場合には粒子産生量に差はなかったが、Syntaxin12 や 16 の C 末端半分の construct の場合には粒子産生量がやや減少した (図 3 下)。この組合せの場合、Gag が syntaxin の局在部位に recruit されていたことから (図 4)、これら syntaxin の C 末端半分の construct は Gag を trap し粒子産生に dominant negative に作用する可能性が考えられた。一方、Syntaxin6 の C 末端半分の construct は粒子産生量を減少させなかった。これと相関するかのよう、産生されたウイルス粒子中にはかなりの Syntaxin6 (C 末端半分) の取り込みが認められた (図 3 下)。この construct の場合、Gag と相互作用できるのかもしれないが、Gag を trap できず dominant negative に作用しないのではないかと推測された。

細胞内の小胞膜輸送は SNARE 複合体の形成によって推進されることが明らかとなっている。SNARE 複合体は vesicle membrane 上の VAMP 分子と target membrane 上の syntaxin 及び SNAP 分子で形成される複合体である (図 2)。本研究で対象とした 3 つの syntaxin のうち、Syntaxin6 は構造的には syntaxin 群に分類されるものの機能的には SNAP 群に分類される分子である。こうした機能的な違いが本研究結果につながった可能性は否定できない。

いずれの syntaxin (full-size) も粒子産生量を変化させなかったが、産生されたウイルス粒子中にはそれらが取り込まれていた (図 3 下)。これは、Gag 蛋白がこれら syntaxin と結合する可能性を示唆する。

恐らく、syntaxin は over-expression されたものの、dominant negative には働かず、ウイルス粒子に取り込まれたものと推察される。

#### E. 結論

酵母細胞でGag輸送の責任宿主因子として特定されたsyntaxinのヒトホモログとHIV-1 (NL43株) のover-expression実験を293T細胞で行った。対象としたsyntaxinのfull-sizeのconstructは粒子産生を阻害しなかったが、産生されたウイルス粒子にはそのsyntaxinが取り込まれた。一方、C末端半分のconstructを共発現させると、細胞内でGag蛋白をtrapし粒子産生を阻害した。こうしたものではそのsyntaxinはウイルス粒子に取り込まれなかった。逆に、ウイルス粒子に取り込まれたものは、粒子産生を阻害しなかった。

#### F. 知的所有権の取得状況

なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Hiroshi Tomoda, Naomi Ohbayashi, Yuko Morikawa, Hidetoshi Kumagai, and Satoshi Omura. Binding site for fungal  $\beta$ -lactose hyme-glucosin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. *Biochim. Biophys. Acta* 1636: 22-28 (2004)
2. Yuko Morikawa, Toshiyuki Goto, and Fumitaka Momose. Human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly through assembly intermediates. *J. Biol. Chem.*, 279: 31964-31972 (2004)

##### 学会発表

#### 1. 森川裕子

HIV 非ミリスチル化 Gag 蛋白による粒子形成出芽の阻害機構  
第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004/11/21-23

2. 横田 (恒次) 恭子、磯貝まや、立川 (川名) 愛、山本拓也、岩本愛吉、森川裕子  
樹状細胞を介したウイルス抗原特異的 T 細

胞の活性化に関する in vitro 評価解析

第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004/11/21-23

3. 百瀬文隆、川口敦史、森川裕子、永田恭介

NP とゲノムを標的とした宿主因子 RAF-2 によるインフルエンザウイルス RNA 合成促進

第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004/11/21-23

4. 森川裕子、川田茂雄

ヒト免疫不全ウイルス非ミリスチル化 Gag 蛋白による粒子アッセムブリーのドミナントネガティブ阻害機構

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004/12/8-11

5. 塘直樹、森川裕子

酵母発現系におけるヒト免疫不全ウイルスのゲノムパッケージング

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004/12/8-11

6. 百瀬文隆、川口敦史、岩松明彦、森川裕子、永田恭介

ウイルス核タンパク質 NP とウイルスゲノムを標的とした宿主因子 RAF-2 によるインフルエンザウイルス RNA の合成促進

第 27 回日本分子生物学会年会、神戸、2004/12/8-11

分担研究報告書

9. Vif 機能制御（Vif およびその結合因子の構造機能解析）

分担研究者 足立昭夫（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部  
ウイルス病原学分野）

研究要旨 HIV-1 複製に必須な Vif の構造機能について解析し、以下の結果を得た。— (1)Vif 中のリジン全てをアルギニンに変えた変異体の細胞内発現レベルは野生株より著明に高い。(2)Vif の低い細胞内発現レベルは 91 および 92 番目のリジンのみで実現する。(3)Vif の 22 および 26 番目のリジンは子孫ウイルス粒子への感染性付与に必須である。(4)Vif はシチジンデアミナーゼ APOBEC3G やユビキチン化に関わる SCF 錯体と結合する。(5)Vif は細胞骨格を形成する蛋白質ピメンチンと相互作用し、これにより安定化される。(6)立体構造解析のための Vif 発現系は確立されたが、可溶化には成功していない。— これらの成績から、Vif のプロテアソーム分解の分子機構解明および Vif の可溶化の達成が次の課題であると結論された。

A. 研究目的

全ての HIV/SIV はゲノム上に *vif* 遺伝子を持つ。これにコードされる Vif 蛋白質はリンパ球やマクロファージ等の自然宿主細胞でのウイルス複製に必須であることが知られ、SIV ではエイズ発症に必須であることも実験的に示されている。我々は最近、HIV-1 感染者由来 Vif の機能解析から、HIV でも同様の可能性があることを報告した。Vif の作用機構は解明されつつあるが、その発現調節や立体構造は未だ不明で、Vif を分子標的とする新規抗 HIV-1 薬の開発は困難な状況である。本研究では、我々の見出した Vif のプロテアソーム分解の分子機序を解析す

ることで、その発現調節機構を解明する。さらに、これらの解析から得られた情報を基に Vif の立体構造の決定をも目指す。

B. 研究方法

1. プラスミド HIV-1 の感染性分子クローン pNL432 およびこれから遺伝子工学的手法で構築した一連の Vif 変異体(リジン/アルギニン変異) を実験に使用した。Vif の高発現にはサブゲノミッククローン pNL-ASCF をした。
2. 細胞とトランスフェクション 293T および H9 細胞を使用した。トラン

スフェクションは、リン酸カルシウム法あるいはエレクトロポレーション法にて行なった。

3. ウエスタンブロット法 Vif は、発現ベクター導入 293T 細胞を可溶化し、抗 FLAG 抗体あるいは抗 Vif 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した。
4. 免疫沈降／ウエスタンブロット法 Vif と相互作用する細胞蛋白質は、発現ベクター共導入 293T 細胞を可溶化し、免疫沈降／ウエスタンブロット法で検出した。
5. 逆転写酵素活性 ウイルス粒子の逆転写酵素活性は  $^{32}\text{P}$ -dTTP を用いて常法で測定した。

### C. 研究結果

1. Vif のリジン／アルギニン変異体の作製およびその性格 我々は既に、Vif が他のアクセサリ蛋白質よりはるかに速やかにプロテアソーム分解を受けることを示している。本年度は、プロテアソーム分解抵抗性 Vif 変異体を作製しその性格を検討した。Vif (NL432 クローン)中に存在する 16 個のリジンを全てアルギニンに変異させ、pNL-ASCF ベクターで 293T 細胞に導入して発現レベルをウエスタンブロット法で解析した。発現量は野生株に比し顕著に上昇した。一連の Vif 変異体を同様に調べたところ、野生株の低い発現レベルは 91 および 92 番目のリジンだけで実現することが明らかになった。また、一連の変異を持つ完全長クローンの H9 細胞での感染性を検討した結果、22 および 26 番目のリジンが必須であることがわかった。
2. Vif および APOBEC3G あるいは SCF 錯体発現ベクターを 293T 細胞に共導入し

免疫沈降／ウエスタンブロット法で解析した結果、Vif がこれらと結合することがわかった。また、細胞骨格を形成するピメンチンと Vif が結合していることも明らかになった。

3. Vif 立体構造決定に向けての取組み 各種 HIV/SIV Vif (HIV-1、HIV-2 および SIVagm)およびその変異体 (感染性付与能が保たれている HIV-1 変異体) の発現および可溶化を、無細胞系 (理化学研究所)、大腸菌系および昆虫細胞系により検討した。HIV-1 Vif については GST あるいは Trx との融合体についても調べた。今までのところ、十分な発現量は得られているが、その可溶化には成功していない。

### D. 考察

本年度の変異体解析により、HIV-1 Vif のプロテアソーム分解がさらに明確に証明されたと言える。今後は、Vif ユビキチン化酵素の同定を軸として研究を進め、Vif の発現調節の分子機構を解明したい。22 および 26 番目リジンのモディファイヤーによる修飾の有無も検討課題である。

立体構造決定に向けての HIV-1 Vif の可溶化には成功しなかった。現在不溶画分に存在する蛋白質のリフォールディングを検討している。また、HIV-1 Vif が APOBEC3G、SCF 錯体およびピメンチンと結合することが我々の実験系で示されたので、これら細胞蛋白質との共発現により Vif の可溶性が向上するか否かを検討していきたい。

### E. 結論

HIV-1 Vif の細胞内発現調節機構の解明と立体構造決定とが、現在我々の最も緊急に



してかつ重要な課題である。これにより、Vif の創薬標的としての適否も明らかになると思われる。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- (1) Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu-Xhilaga, M., Adachi, A., and Strebel, K. 2004. High level expression of Human Immunodeficiency Virus type-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the p2/NC processing site. *Journal of Biological Chemistry* 279: 12355-12362.
- (2) Sugahara, F., Uchiyama, T., Watanabe, H., Shimazu, Y., Kuwayama, M., Fujii, Y., Kiyotani, K., Adachi, A., Kohno, N., Yoshida, T., and Sakaguchi, T. 2004. Paramyxovirus Sendai virus-like particle formation by expression of multiple viral proteins and acceleration of its release by C protein. *Virology* 325: 1-10.
- (3) Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A. 2004. Expression of HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation. *Microbes and Infection* 6: 791-798.
- (4) Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A., Adachi, A., and Fujita, M. 2004. Functional analysis of HIV-1 vif genes derived from Japanese long-term nonprogressors and progressors for AIDS. *Microbes and Infection* 6: 799-805.
- (5) Piroozmand, A., Koyama, A.H., Shimada, Y., Fujita, M., Arakawa, T., and Adachi, A. 2004. Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 641-645.
- (6) Nagao, T., Yoshida, A., Sakurai, A., Piroozmand, A., Jere, A., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2004. Determination of HIV-1 infectivity by lymphocytic cell lines with integrated luciferase gene. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 1073-1076.
- (7) Jere, A., Piroozmand, A., Tripathy, S., Paranjape, R., Sakurai, A., Fujita, M., and Adachi, A. 2004. Generation and characterization of HIV-1 clones chimeric for subtypes B and C *nef*. *International Journal of Molecular Medicine* 14: 1087-1090.
- (8) Wang, H., Sakurai, A., Khamsri, B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A., and Fujita, M. Unique characteristics of HIV-1 Vif expression. *Microbes and Infection*,

in press.

## 2. 学会発表

- (1) Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu-Xhilaga, M., Lee, Y.-J., Adachi, A., and Strebel, K. (2004) High-level expression of HIV-1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of the Gag precursor at the P2/NC processing site. The 2004 Cold Spring Harbor meeting on retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- (2) Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A. (2004) Profile of the proteasome-degradation of HIV-1 Vif. The 2004 Cold Spring Harbor meeting on retroviruses, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- (3) Fujita, M., Khamsri, B., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Akari, H., Strebel, K., and Adachi, A. (2004) Proteasome-degradation of HIV-1 Vif and its biological significance. The Awaji International Forum on Infection and Immunity, Hyogo, Japan.
- (4) Adachi, A. (2004) Functional and structural analysis of HIV accessory proteins which are essential for viral replication and pathogenesis. AIDS Seminar in Kumamoto, Kumamoto, Japan.
- (5) Khamsri, B., Sakurai, A., Jere, A., Uchiyama, T., Adachi, A., and Fujita, M. (2004) Construction and characterization of the arginine mutants of HIV-1 Vif. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.
- (6) Jere, A., Sakurai, A., Yoshida, A., Fujita, M., and Adachi, A. (2004) Generation and characterization of HIV-1 Nef point mutants. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.
- (7) 藤田美歌子、カムセー プンルアン、櫻井明子、アプハイ ジェレ、内山恒夫、足立昭夫 (2004) HIV-2 Vpx および Vpr の発現量の解析. 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜.
- (8) 足立昭夫 (2004) Structural and functional analysis of accessory proteins essential for HIV replication. 第18回日本エイズ学会学術集会シンポジウム、静岡.
- (9) 藤田美歌子、足立昭夫 (2004) HIV-1 Vif : アルギニン変異体の作製およびその性質. 第18回日本エイズ学会学術集会、静岡.

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

厚生労働科学研究費補助金エイズ対策研究事業「HIVの増殖・変異の制御に関する研究」  
分担研究報告書

10. HIV-1 Vif 機能制御: Vif 新規機能探索

分担研究者 明里宏文 (国立感染症研究所 筑波霊長類センター・エイズ研究センター)  
研究協力者 李永仲、飯島沙幸

研究要旨: HIV-1 Vif はウイルス感染性保持に重要な役割を示す。ところが Vif を過剰発現すると、それに相関してウイルス粒子内 Vif (v-Vif) も増加し、結果としてウイルスの感染性が顕著に低下する。すなわち Vif は HIV にとって両刃の剣である。過剰量 v-Vif は Gag p2/NC プロセシングのみを特異的に抑制することでウイルス成熟過程を阻害し、この作用は Vif N 末端側領域により規定されていることを明らかにした。そこで一連の Vif 欠失変異体を作成し、より詳細な解析を行ったところ、Vif 22-25 アミノ酸残基を欠失することにより Vif 発現量が上昇する結果、効率的に HIV 粒子にパッケージされることを見いだした。この変異体は野生型 Vif に対しても dominant-negative に作用した。一方 10-13 アミノ酸残基はプロテアソーム分解を負に制御し、欠失変異により Vif 発現量が顕著に低下することが明らかとなった。これらの知見は Vif 新規機能の生理的意義の解明や、上記 Vif 作用を応用したウイルス粒子成熟過程の新規制御法開発に有用であると考えられた。

A. 研究目的

Vif タンパク質は、宿主細胞依存性に HIV-1 の感染性を増強する。この理由として、Vif は HIV 抑制因子である apobec-3G(Apo)の細胞内分解を促進するとともにウイルス粒子への取り込みを阻害することで抗 Apo 活性を示すとされている。一方、我々はウイルス粒子にパッケージされる Vif に着目して研究を行ってきた。すなわち、Vif は viral genomic RNA 依存性にウイルス粒子にパッケージされること、粒子内 Vif は Core 内で viral genomic RNA と共局在することを示した (Journal of Virology, 2002)。さらに、Vif を細胞内で過剰発現すると、それに相関してウイルス粒子内 Vif (v-Vif) も増加し、結果としてウイルスの感染性が顕著に低下することを見出した。重要なことに、過剰量 V-Vif は Gag p2/NC プロセシングのみを特異的に抑制することでウイルス成熟過程を阻害し、この作用は Vif N 末端側領域により規定されていた (Journal of Biological Chemistry,

この作用は permissive cell で産生されたウイルスでも認められることから、Apo と独立した新たな Vif 機能であると考えられた。本研究では一連の Vif 欠失変異体を作成し上記 Vif 機能に関わる N 末端領域をより詳細に解析し、その分子機構を明らかにすることを目標とした。

B. 研究方法

HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNL1-43Vif を基に、site-directed mutagenesis 法により導入した一連の Vif N 末端欠失変異体発現ベクターを作成した。これらを HIV-1 分子クローンである pNL4-3Δenv, VSV-G 発現ベクターと共に H9 細胞または HeLa 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後ウイルスおよび導入細胞を回収した。ウイルスタンパク質は Western blotting 法により解析を行った。ウイルス感染性は LuSIV 細胞を用いた single-round infectivity assay により評価した (図1左)。

2004)。

### C. 研究結果

HIV-1 Vif タンパク質発現ベクターである pNLA1-43Vif を基に一連の Vif N 末端欠失変異体発現ベクターを作成した。これらを HIV-1 分子クローンである pNL4-3 $\Delta$ env, VSV-G 発現ベクターと共に non-permissive 細胞である H9 細胞へ遺伝子導入し、24 時間後得られたウイルスの感染性を LuSIV 法により測定した。pNLA1-43Vif により野生型 Vif を過剰発現することにより、得られたウイルスの感染性は顕著に低下した。ところが 10-13 アミノ酸残基の欠失変異により感染性抑制作用は完全に消失した。一方、22-25 アミノ酸残基の欠失変異では逆に野生型 Vif よりも強い感染抑制効果が認められた (図 1 右)。

次に、この現象が細胞依存性であるかどうかを検討するため、permissive 細胞である HeLa 細胞を用いて上記と同様に遺伝子導入してウイルスを回収し、その感染性を検討した。その結果、H9 細胞と同様に、10-13 アミノ酸残基の欠失変異により感染性抑制作用は完全に消失する一方、22-25 アミノ酸残基の欠失変異では野生型 Vif よりも強い感染抑制効果が認められた (data not shown)。以上のことから、これらの領域が司る感染性制御は細胞非依存性に作用することが示された。

次に、これらの現象がどのような機構によるのかを明らかにするため、遺伝子導入して得られた細胞およびウイルスについて Western blotting 法により解析を行った (図 2 左上)。興味深いことに、感染性抑制作用が完全に消失した 10-13 アミノ酸残基の欠失変異体では細胞内での Vif 発現、ウイルス粒子へのパッケージングのどちらもほとんど認められなかった。一方、野生型 Vif よりも強い感染抑制効果が認められた 22-25 アミノ酸残基の欠失変異では逆に野生型 Vif に比べ顕著な発現増強が認められ、ウイルス粒子へのパッケージングも同様に増加していた。以上より、これら 2 つの領域は Vif 発現を正または負に制御することが示された。この制御がプロテアソーム分解に関与しているかどうかを調べるため、10-13 アミノ酸残基の欠失変異体を発現した HeLa 細胞に

テアソーム阻害薬であるラクタシスチンを処理したところ、その細胞内発現が顕著に回復した (図 2 右上)。このことから、この欠失変異体はプロテアソーム分解に高感受性であり、この領域が Vif のプロテアソーム分解抑制に重要な役割を有することが明らかとなった。

### D. 考察

本研究では、我々が最近見出した「過剰 v-Vif による HIV 感染性抑制効果」のメカニズムをより詳細に明らかにすることを目的とした。その成果は以下の通りである：(1) 10-13 アミノ酸残基は

Vif のプロテアソーム分解抑制に重要な役割を有する。(2) 22-25 アミノ酸残基の欠失変異体は野生型 Vif に比べ顕著な発現増強が認められ、ウイルス粒子へのパッケージングも同様に増加していた。この結果野生型 Vif よりも強い感染抑制効果を示した。

(1) に関して：これまで Vif は他のアクセサリ蛋白に比べてプロテアソーム分解を強く受けるため半減期が非常に短いことが知られていた。しかし今回の知見から、Vif は安定化のためのメカニズムも持つことが示唆された。おそらく Vif 本来の機能発現にはプロテアソーム分解に対して一過性に抵抗性であることが必要であることが考えられる。今後はさらにこの分解制御に関する詳細な分子機構を解析していきたい。

(2) に関して：22-25 アミノ酸残基の欠失変異では野生型 Vif に比べ顕著な発現増強が認められ、ウイルス粒子へのパッケージングも同様に増加していたことから、この領域がプロテアソーム分解 machinery の結合ドメインである可能性が示唆される。上記分解制御機構との関連性は大変興味深いと思われた。ところで、この変異体が野生型 Vif よりも強い感染性抑制効果が認められたことは、このドミナントネガティブ変異体をベースとした HIV 阻害システムの可能性を示唆するものである。今後は抗 APO 活性を