

プロ

E. 結論

Vif 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から、Vif は安定化のためのメカニズムを保持していることが示唆された。一方、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。この変異体は抗 apobec 活性を失っており、また野生型 Vif に対しても dominant-negative に作用した。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nguyen KL, Llano M, Akari M, Miyagi M, Poeschla EM, Strebel K, Bour S: Codon optimization of the HIV-1 *vpu* and *vif* genes stabilizes their messenger RNA and allows for highly efficient Rev-independent expression. *Virology*, 319, 163-175, 2004.

(2) Akari H, Fujita M, Kao S, Khan MA, Shehu-Xhilaga M, Adachi A, Strebel K: High level expression of Human immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of Gag precursor at the p2/NC processing site. *Journal of Biological Chemistry* 279, 12355-12362, 2004.

(3) Uda A, Tanabayashi K, Yamada YK, Akari H, Lee YJ, Mukai R, Terao K, Yamada A: Detection of Fourteen Alleles Derived from MHC Class IA Locus in Cynomolgus Monkeys. *Immunogenetics* 56, 155-163, 2004.

消失し、且つパッケージング効率がより優れた“minimum i-Vif”の開発を目指していきたい。

(4) Fujita M, Akari H, Sakurai A, Yoshida A, Chiba T, Tanaka K, Strebel K, Adachi A: Expression of the HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation. *Microbes and Infection* 6, 791-798, 2004.

2. 学会発表

(1) 李永仲、飯島沙幸、明里宏文：HIV-1 Vif 蛋白による Gag p2/NC プロセッシング制御に関する解析。第18回日本エイズ学会学術集会、平成16年12月

G. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

図1. Vif N 末端欠失変異体による HIV-1 感染性抑制効果

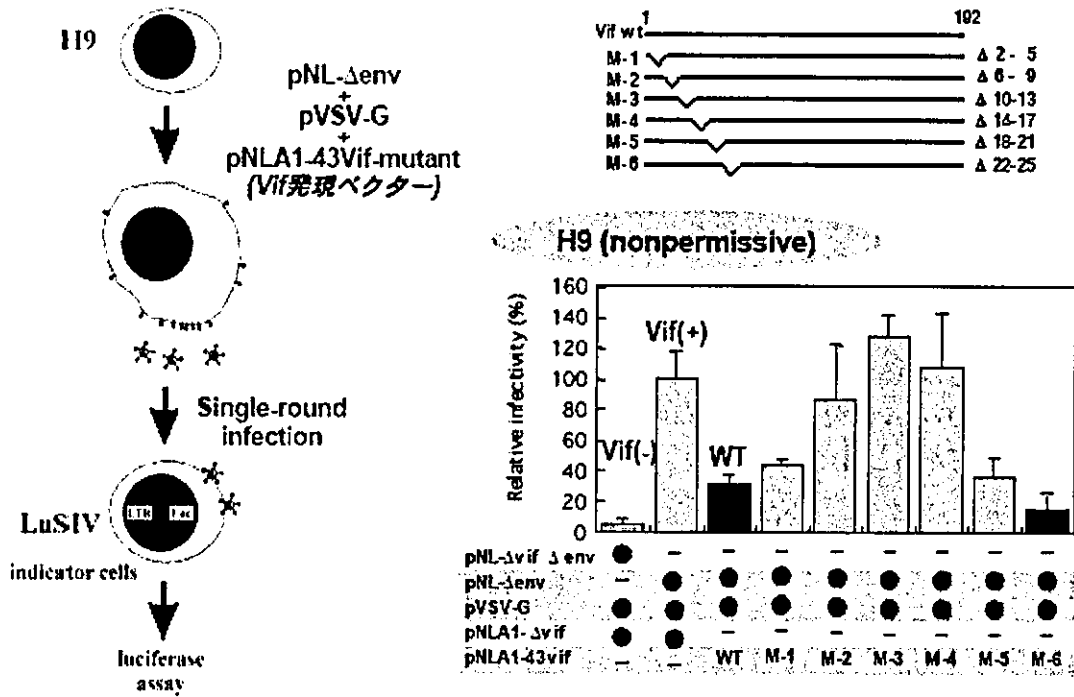
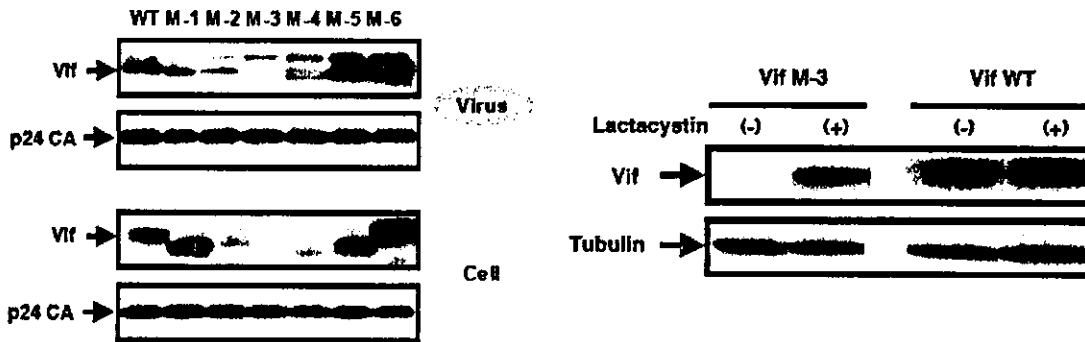


図2. Vif N 末端欠失変異体の発現解析



Summary of biological characteristics in Vif mutants.

Effects on:	WT	M-3	M-6
Viral infectivity	↓	No	↓
Vif in virus	+	-	++
Vif in cells	+	-	++

11. HIV-1 Vpr 機能制御：Vpr 誘導細胞周期異常の機構解明

分担研究者 増田 道明 獨協医科大学・微生物学講座・教授

研究要旨 HIV-1 のアクセサリ-蛋白 Vpr は宿主細胞周期の G2 期から M 期への進行を抑制する (G2/M arrest)。この現象は、組込み前のプロウイルス DNA の安定化や LTR の転写活性の増強等を介して、HIV-1 の増殖促進に寄与すると考えられている。しかし、Vpr による G2/M arrest の誘導機構については不明の点が多い。本年度は、分裂酵母を用いた分子遺伝学的実験や、アデノウイルスベクターおよび siRNA を用いたヒト培養細胞の遺伝子発現操作により、シグナル伝達分子の一種である 14-3-3 が Vpr による G2/M arrest の誘導に関与することを示した。また、HIV-1 と同じレンチウイルスであり、有用な動物モデルと考えられるネコ免疫不全ウイルス (FIV) のアクセサリ-蛋白 Orf-A がヒトやネコ由来の培養細胞や分裂酵母細胞に G2/M arrest を起こすことを見出した。さらに、分裂酵母を用いた実験結果から、Vpr と Orf-A は同様の機序で G2/M arrest を誘導する可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) がコードする Vpr は多様な機能を持つアクセサリ-蛋白である。特に、宿主細胞周期の G2 期から M 期への進行を抑制する (G2/M arrest) 作用は、組込み前のプロウイルス DNA の安定化や LTR の転写活性の増強等を介して、HIV-1 の増殖に対して促進的に働くと考えられている。しかし、Vpr が G2/M arrest を起こすメカニズムについては不明の点が多い。

本研究は、種々のモデル実験系を活用しながら、HIV-1 Vpr と機能的あるいは物理的に相互作用する宿主因子を同定し、その相互作用が G2/M arrest の誘導につながる機序を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

【分裂酵母用発現ベクター】Vpr の発現には、*nmt1* プロモータ (チアミン非存在下で活性化) の下流に HIV-1_{NL4.3} の *vpr* 遺伝子を持つ pREP1-*vpr* (Masuda et al., 2000) を用いた。

HeLa 細胞の total RNA を用いた RT-PCR により、ヒト 14-3-3 β 、 ϵ 、 ζ 、 θ および σ の cDNA を単離した。同様に、HEK293 細胞の total RNA およびヒト脳 mRNA (Clontech 社) を鋳型として 14-3-3 γ および η の cDNA をそれぞれ単離した。各 cDNA を pAUR224 の CMV プロモータの下流にクローニングし、7 種類のヒト 14-3-3 発現プラスミドを構築した。

FIV TM219 株 (帯広畜産大・宮沢孝幸博士より分与) の *orf-A* 遺伝子を PCR により増幅し、His 標識用の断片を付加して分裂酵母用発現ベクター pREP-1 の *nmt1* プロモータの下流につなぎ、pREP1-His-*orf-A* を構築した。

【分裂酵母形質転換株の作成】野生株あるいは *wee1*、*rad24*、*ppa2* 遺伝子欠損株 (東京大学・岡山博人博士より分与) の分裂酵母に酢酸リチウム法によりプラスミドを導入した。pREP1-*vpr* および pREP1-His-*orf-A* についてはロイシン非要求性を、14-3-3 発現プラスミドについては aureobacillin 耐性を指標として形質転換株を得た。Vpr、His 標識 Orf-A、14-3-3 の発現はウエスタン法により解析した。

【分裂酵母の細胞周期解析】各形質転換株をチアミン存在下および非存在下で培養し、G2/M arrest の誘導を *cdc* phenotype の有無により判定した。一部の実験では、チアミン存在下で 3~6 時間 bleomycin (50 μ M/ml) 処理し DNA を傷害した際の G2/M arrest の誘導を同様に判定した。

【哺乳動物培養細胞における遺伝子発現操作】ヒト胎児肺由来 MRC5 細胞に Vpr と EGFP を共発現するアデノウイルスベクター Ad-VIG (Matsuda et al., 2003) を感染させた。一部の実験では、ベクター感染の 24 時間前に 14-3-3 β に対する siRNA (Santa Cruz 社) を導入した。14-3-3 蛋白の発現はウエスタン法

により解析した。

Adeno-X expression system (Clontech 社) を用いて、Orf-A と EGFP を共発現するアデノウイルスベクター Ad-OIG を構築し、HeLa 細胞およびネコ由来 CRFK 細胞に感染させた。

【哺乳動物細胞の細胞周期解析】細胞核を PI で染めたものをフローサイトメータで観察するか、あるいは細胞を PFA 固定後に核を DAPI で染め、レーザースキャニングサイトメータで観察した。

C. 研究成果

以前の報告 (Masuda et al., 2000) と同様、*rad24* 遺伝子を欠損した分裂酵母変異株では Vpr による G2/M arrest が見られなかったが、ヒト 14-3-3β あるいはその cDNA を導入したところ、Vpr による G2/M arrest への感受性が回復した。14-3-3ε でも軽度の回復が認められた。他のヒト 14-3-3 isoform は分裂酵母では正常な発現が検出されなかった。

ヒト胎児肺由来 MRC5 細胞に Ad-VIG を感染させ Vpr を発現したところ、G2/M arrest の誘導が観察された。一方、siRNA を用いて 14-3-3β の発現を抑制した条件で Ad-VIG を感染させた場合は、G2/M arrest の誘導が認められなかった。

HeLa 細胞およびネコ由来 CRFK 細胞に Ad-OIG 感染させると、G2/M arrest の誘導が観察された。また、His 標識 Orf-A を分裂酵母野生株で発現させた場合も G2/M arrest が認められた。一方、His 標識 Orf-A を *wee1*、*rad24* あるいは *ppa2* 遺伝子の欠損株で発現させた場合には G2/M arrest の誘導が認められなかった。

D. 考察

分裂酵母における Vpr による G2/M arrest には Rad24 が必須である (Masuda et al., J. Virol., 2000)。Rad24 は哺乳動物の 14-3-3 ファミリー蛋白のホモログである。本研究により、14-3-3β およびその cDNA は分裂酵母の *rad24* 欠損変異を補完し、Vpr による G2/M arrest の誘導に対する感受性を賦与することが明らかとなった。さらに、ヒト培養細胞において 14-3-3β の発現を抑制すると、Vpr による G2/M arrest が見られなくなった。これらの結果は Vpr がヒトの細胞において G2/M arrest を誘導する

際、14-3-3β が重要な働きをしていることを強く示唆するものである。14-3-3β は G2 期から M 期への移行を抑制する WEE1 蛋白の安定化に寄与するという報告がある (Wang et al., Cell Growth Differ., 2000)。

FIV Orf-A はヒトやネコ由来の培養細胞に G2/M arrest を誘導することがわかった。また、分裂酵母にも G2/M arrest を起こし、その際 Wee1、Rad24、Ppa2 といった宿主因子が必須であった。これらの性質は Vpr とよく似ており、レンチウイルスのアクセサリー蛋白の機能的相同性が伺われる。

E. 結論

ヒト細胞における Vpr の機能発現、特に細胞周期異常の誘導機構を明らかにする上で、分裂酵母や FIV Orf-A は有用なモデルであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Ishii T., Fujishiro M., Masuda M., Goshima Y., Kitamura H., Teramoto S., and Matsuse T. Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells. Eur. Respir. J., 23:665-670, 2004.

2. 学会発表

- (1) Masuda, M., Matsuda, N., Watanabe, A., Yamazaki, A., Tanaka, H., Matsuda, M., Fujisawa, R., and Yamamoto, K. Human 14-3-3 proteins confer susceptibility to the cell cycle arrest induction by HIV-1 Vpr upon *Schizosaccharomyces pombe*. The 2004 Meeting on Retroviruses, Cold Spring Harbor, May, 2004.
- (2) 増田道明、松田真理、鈴木順一郎、藤澤隆一、宮沢孝幸、山本勝彦. HIV Vpr と FIV Orf-A による宿主細胞周期 G2/M arrest に見られるレンチウイルスアクセサリー蛋白の機能的相同性. 日本ウイルス学会第 52 回学術集会, 横浜, 平成 16 年 11 月.
- (3) 松田直人、松田真理、藤澤隆一、山本勝彦、増田道明. Vpr による G2/M arrest への 14-3-3 の関与の可能性: 分裂酵母を用いた解析. 日本ウイルス学会第 52 回学術集会, 横浜, 平成 16 年 11 月.

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

研究協力者報告書

12. HIV の増殖・変異の制御に関する研究

- HIV 粒子のプロテオーム解析 -

協力研究者 三隅将吾 熊本大学・大学院医学薬学研究部・薬学生化学 助教授

研究要旨：本研究における HIV 粒子のプロテオーム解析は、ウイルス粒子を構成する蛋白質のうちウイルス複製に必須である新規細胞性蛋白質及び翻訳時・後修飾を明らかにすることによって、HIV の増殖・変異に関する未知の制御過程を解明し、新たな作用機序を持つ抗 HIV 薬を開発するための科学基盤を提供することにある。以下に本年度の研究成果を報告する。

1) R5 ウイルス及び X4 ウイルスの粒子内 p24 の一部は、ともにそのアミノ末端 Pro₁ がホルミル化の修飾を受けていることが明らかになった。ホルミル化 p24 capsid 蛋白質のウイルス複製における意義・役割は、現在解析中であるが、p24 間の相互作用に重要な役割を担っていることが知られており、このホルミル化と core 形成およびその disassembly との関連性が示唆される。

2) R5 ウイルス及び X4 ウイルス粒子内に宿主由来の peptidyl-prolyl cis-trans isomerase cyclophilin A (CyPA) の 4 個の isoform を同定した (pIs 6.0, 6.4, 6.53, 6.88)。これらの中 CyPA_{6.53} は、アミノ末端がアセチル化を受けていることが同定された。さらに、CyPA_{6.88} は、ウイルス粒子外にも同定され、この CyPA_{6.88} は、ウイルス粒子が出芽後、成熟化する際にウイルス粒子内からウイルス粒子外へ再分布することがわかった。ウイルスが宿主のディフェンス機構 (LV1/ref1 restriction) を回避する機構とウイルス粒子内の CyPA isoforms の関係を今後明らかにしたい。

A. 研究目的

蛋白質は、ゲノムから転写・翻訳された後、その機能に直接影響する様々な翻訳時・後修飾を受けるものが多く存在することが知られている。つまり、疾患のメカニズムの解明のためにヒトゲノムに存在する約 3 万の遺伝子を解析するのみでは困難であるということである。また、細胞内での mRNA の発現量と蛋白質の産生量は必ずしも一致せず、蛋白質の安定性や、蛋白質-蛋白質相互作用は遺伝子を見ているだけでは解明できない。このようなことから、蛋白質を網

羅的に分析するプロテオーム解析は注目されている。

本研究では、ウイルス粒子中の蛋白質のプロテオーム解析をおこなうために、HIV 粒子の精製から手がけ、精製したウイルス粒子中の宿主蛋白質の同定や蛋白質の翻訳時・後修飾の解析することにより、蛋白質分子レベルでウイルスの複製過程を理解することを目的とする。さらに、ディファレンシャルプロテオーム解析により HIV 準種の粒子成分の生化学的性質の違いを同定し、複製と変異発生における生物学的意義を検

証し、新たな制御因子を見いだすことを目的とする。

B. 研究方法

1) 精製ウイルス粒子の調製

HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1、CEM-CCR5/JRFL) の培養上清をフィルター濾過後、超遠心し、ウイルスと microvesicle 混合物を得たのち、得られた沈査をズブチリシンで処理し、さらに SepharoseCL-4B カラムを用いてゲル濾過した精製ウイルスを可溶化しプロテオーム解析の試料とした。

2) 2次元ゲル電気泳動及び染色法

二次元電気泳動は、一次元目を固定化 pH ゲル (pH6-11L) で、二次元目をアクリルアミドゲル (12-14%) で行い、銀染色およびサイプロルビーで染色した。

3) Peptide mass fingerprint (PMF) 法および Post source decay (PSD) による蛋白質の同定・解析

最終的に蛋白質の同定はトリプシンによる酵素処理、MALDI TOF-MS による質量分析、及びデータベース検索により作製した。

C. 実験結果

HIV-1 粒子の HIV 粒子のプロテオーム解析を行うにあたりウイルス粒子のみを得る必要がある。そこで HIV-1 持続感染細胞 (CEM/LAV-1, CEM-CCR5/JRFL) の培養上清中に、ウイルス粒子とともに放出される microvesicle を除去するために、超遠心により得られたウイルス沈査からゲル濾過に

よって血清由来のアルブミンを除去後、ズブチリシンを作用させることにより、microvesicle をほぼ完全に除去することに成功した。ただし、この時、得られたウイルス粒子は、同時にウイルス表面の gp120 もズブチリシンにより除去されているが、ウイルス粒子内のウイルス構成蛋白質には影響がなかった。本研究では、ウイルスの複製に必須であるウイルス粒子内の構成蛋白質の同定とその翻訳時・後修飾の同定を目的としているためこのズブチリシン処理ウイルス粒子を以下のプロテオーム解析のサンプルとして用いプロテオーム解析を行った。これまでの研究で X4 ウイルスである HIV-1_{LAV-1}p24 の N 末端 tryptic peptide (1-18) の理論値から分子量が約 28 異なる分子量 2044 の tryptic peptide が得られ、この peptide は、0.6 N HCl 処理により 2044 のピークが消失したこと及び PSD による解析から、N 末端 Pro がホルミル化されていることを明らかにした。本年度、R5 ウイルスについても同様の解析を行った結果、Fig. 1 に示すように HIV-1_{LAV-1} 粒子のみならず、HIV-1_{JRFL} 粒子中の p24 の一部も、ホルミル化を受けていることがわかった。p24 は、ウ

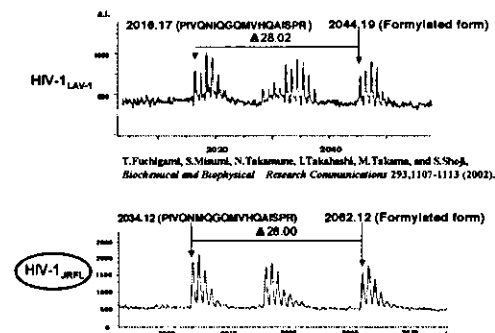


Fig. 1. Formylation of p24 N-terminal May Be A General Modification

ウイルスが成熟する際に、Gag 前駆体蛋白質の p17-p24 結合部位が HIV-1 protease によって切断されることにより生じることから、X4 ウイルスのみならず R5 ウイルス由来の p24 の一部のホルミル化は、Gag 前駆体蛋白質が HIV-1 protease によってプロセシングされた後に翻訳後修飾を受けていることが示唆された。

次に、これまでに X4 ウイルス粒子には等電点の異なる 3 つの cyclophilin A (CyPA) isoform (pIs 6.40, 6.53, and 6.88) が取り込まれていることを報告してきた。これら isoform の内、pI 6.53 の isoform は、N 末端がアセチル化を受けていることが N 末端 tryptic peptide(1-18)の PSD 解析及び N-acylamino acid releasing enzyme を明らかにした。さらに pI 6.88 の isoform は、subtilisin 処理により 2D gel 上からそのスポットが消失するとともに、実際に電子顕微鏡を用いたウイルス粒子の解析からウイルス粒子表面に存在することが明らかにしてきた (*J. Virol.* 76:10000-10008., 2002)。本年度、X4 ウイルス粒子のさらなる詳細な解析の結果、Fig. 2 に示すようにウイルス粒子内に等電点 6.0 の第 4 の CyPA isoform を発見した。

さらに R5 ウイルスについても同様の解析を行った結果、HIV-1_{LAV-1} 粒子のみならず、HIV-1_{JRFL} 粒子中にも少なくとも 4 つの CyPA isoform が存在することが明らかになった。

D. 考察

HIV-1 p24 のアミノ末端 Pro₁ は、Asp₅₁ と

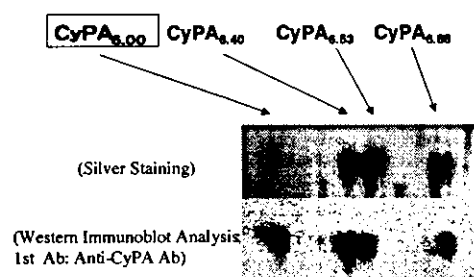


Fig. 2. Four Isoforms of Cyclophilin A Associated with HIV-1

salt bridge を形成することにより HIV-1 p24 間の相互作用に必要なβ-hairpin 構造形成に重要な役割を担っていることが知られており (Gitti et al., *Science* 273 (1996)231 -235)、HIV-1 p24 のアミノ末端がホルミル化されることによりβ-hairpin 構造形成が阻害され、その結果、HIV-1 p24 間の相互作用が弱められ、ウイルスが宿主細胞へ感染後、HIV-1 p24 core が disassembly される際にホルミル化が寄与している可能性が示唆された。今後、HIV-1 protease が p17-p24 部位を切断後、生じる p24 のアミノ末端がどのようにホルミル化を受けるのかを解明することは、ウイルスが disassembly する際に必要な新たな制御因子を見いだせる可能性がある。

さらに、本研究により X4 ウイルスだけでなく R5 ウイルス粒子には、少なくとも 4 つの CyPA isoform が存在することが観察された。現在のところ、これらの CyPA isoform が何故ウイルス粒子中に取り込まれているのかについては明解な結論は得られていないが、ウイルスが宿主細胞に感染する際には、宿主のディフェンス機構 (LV-1/ref1 restriction) を回避するために、CyPA が必要であるという研究報告が他のグループによってなされていることもあり、今後ウ

ウイルス粒子内の CyPA isoform の生物学的意義解明を目指したい。なお、宿主細胞内に発現している CyPA isoform とウイルス粒子に取り込まれている CyPA isoform の関係も今後明らかにしていくつもりである。

E. 結論

プロテオーム解析は、ウイルス複製に必須である新規の蛋白質や翻訳時・後修飾を同定することにより蛋白質分子レベルでウイルスの複製過程を理解する上で有効な手段になり得る。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Misumi, S., Takamune, N., and Shoji, S. Proteomics of HIV-1 virion. BIOMEDICAL AND PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF PROTEOMICS (Editor H. Hondermarck) Kluwer Academic Publisher, The Netherland. Chapter 14: 339-366, 2004.
- 2) Misumi, S., Takamune, N., Ohtsubo, Y., Waniguchi, K., and Shoji, S. Zn²⁺ binding to cysteine-rich domain of extracellular human Immunodeficiency virus type-1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis. AIDS Res. Hum. Retroviruses. 20: 297-304, 2004.
- 3) Misumi, S., Morikawa, Y., Tomonaga, M., Ohkuma, K., Takamune, N., and Shoji, S. Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Virion Autolysis by

Autologous p2gag Peptide. J. Biochem. 135: 447-453, 2004.

- 4) Hasegawa, N., Takamune, N., Misumi, S., and Shoji S. Proteome analysis of purified HIV-1 virions. 5th AIDS seminar in Kumamoto, International symposium, September 9-10, 2004, Kumamoto, Japan

III. 業績一覽 (2004)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者名	題名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Okamoto, T.	Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis	Y-J. Surh., and L. Packer.	Oxidative Stress, Inflammation and Health	Marcel Dekker(U SA)	USA	2005	In press
岡本 尚	ウイルス性出血熱	山口 徹、北原光夫編	今日の治療指針 2004年版	医学書院	東京	2004	130-131
岡本 尚	新興・再興感染症の現状と今後	吉原なみ子	臨床病理レビュー特集号 流行感染症の脅威：最新情報とその対策	臨床病理刊行会	東京	2004	31-38
Misumi, S., Takamune, N., and Shoji, S.	Proteomics of HIV-1 Virion	H. Hondermarck.	Biomedical and Pharmaceutical Applications	Kluwer Academic Publishers	Netherlands	2004	339-365

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
佐藤 裕徳					
Kinomoto, M., Yokoyama, M., Sato, H. , 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
駒野 淳					
Miyauchi, K., Komano, J. , Yokomaku, Y., Sugiura, W., Yamamoto, N., Matsuda, Z.	Role of the specific amino acid sequence of the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 in membrane fusion.	J Virol.			In press
Komano, J. , Miyauchi, K., Matsuda, Z., Yamamoto, N.	Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of Both Intracellular Mature	Mol. Biol. Cell.	15	5197-5207	2004

	Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses.				
村上 努					
なし					
櫻木 淳一					
なし					
高橋 秀宗					
Hasegawa, H., Ichinohe, T., Strong, P., Watanabe, I., Ito, S., Tamura, S., Takahashi, H. , Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., and Sata, T.	Protection against influenza virus infection by intranasal administration of HA vaccine with chitin microparticles as an adjuvant.	J. Med. Virol.	75	130-136	2005
Hasegawa, H., Katano, H., Tanno, M., Masuo, S., Ae, T., Sato, Y., Takahashi, H. , Iwasaki, T., Kurata, T., and Sata, T.	BCL-6-positive human herpesvirus 8-associated solid lymphoma arising from liver and spleen as multiple nodular lesions.	Leuk. Lymphoma	45	2169-2172	2004
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
Takahashi, H. , Sawa, H., Hasegawa, H., Nagashima, K., Sata, T., and Kurata, T.	Topoisomerase I dissociates human Immunodeficiency virus Type 1 (HIV-1) reverse transcriptase from genomic RNAs.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	313	1073-1078	2004
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, psi promote the budding of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1).	Microbiol. Immunol.	48	111-118	2004
西澤 雅子					
なし					
岡本 尚					
Tozawa, K., Okamoto, T. , Kawai,	Positive correlation between sialyl Lewis	Kidney Int.			In press

N., Hashimoto, Y., Nagata, D., Hayashi, Y., and Kohri, K.	X expression and pathological findings in renal cell carcinoma.				
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 I κ B kinase inhibitor.	Clin. Can. Res.			In press
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			In press
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.			In press
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
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
原田 信志					
Song, W., Maeda, Y., Tenpaku, A., Harada, S. , and Yusa, K.	Persistence of mutations during replication of an HIV library containing combinations of selected protease mutations.	Antiviral Res.	61	173-180	2004
Kumagai, E., Tominaga, M., and Harada, S.	Sensitivity of chronically HIV-1 infected HeLa cells to electrical stimulation.	Appl. Microbiol. Biotechnol.	63	754-758	2004
Yusa, K., and Harada, S.	Acquisition of multi-PI (protease inhibitor) resistance in HIV-1 in vivo and in vitro.	Current Pharmaceutical Design	10	4055-4064	2004

Harada, S. , Akaike, T., Yusa, K., and Maeda, Y.	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	374-355	2004
Harada, S. , Yusa, K., and Maeda, Y.	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	2004
服部 俊夫					
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 Infect.			In press
Ling, H., Usami, O., Xiao, P., Gu, H-G., and Hattori, T.	The N-terminal of the V3 loop in HIV-1 gp120 is responsible for its conformation-dependent interaction with cell surface molecule(s).	AIDS Res. Hum. Retrovir.	20	213-218	2004
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 Infect.	6	414-420	2004
小島 朝人					
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
Yokomaku, Y., Miura, H., Tomiyama, H.,	Impaired processing and presentation of	J. Virol.	78	1324-1332	2004

Kawana-Tachikawa, A., Takiguchi, M., Kojima, A. , Nagai, Y., Iwamoto, A., Matsuda, Z., and Ariyoshi, K.	cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitopes are major escape mechanisms from CTL immune pressure in human immunodeficiency virus type 1 infection.				
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, psi, promote the budding of human immunodeficiency virus tipe-1 (HIV-1).	Microbiol. Immunol.	48	111-118	2004
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
久保 嘉直					
Katane, M., Fujita, R., Takao, E., Kubo, Y. , Aoki, Y., and Amanuma, H.	An essential role for the His-8 residue of the SDF-1a-chimeric, tropism-redirected Env protein of the Moloney murine leukemia virus in regulating postbinding fusion events.	J. Gene Med.	6	260-267	2004
Kubo, Y. , Ishimoto, A., Ono, T., Yoshii, H., Tominaga, C., Mitani, C., Amanuma, H., and Yamamoto, N.	Determinant for the inhibition of ecotropic murine leukemia virus infection by N-linked glycosylation of the rat receptor.	Virology	330	82-91	2004
Kubo, Y. , Ishimoto, A., Amanuma, H., and Yamamoto, N.	Control of membrane fusion activity by the C-terminal tail of retroviral envelope glycoproteins.	Recent Res.Devel. Virol.	6	1-12	2004
間 陽子					
Yamanishi, K., Pichl, L., Nitahara-Kasahara, Y., and	Molecular dynamics simulation of lipid-protein ensembles.	Internationa l Journal of Bioelectrom			In press

Aida, Y.		agnetism			
Kamata, M., Nitahara- Kasahara, Y., Miyamoto, M., Yoneda, Y., and Aida, Y.	Importin- α promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr	J. Virol.			In press
Takahashi, M., Tajima, S., Okada, K., Davis, W. C., and Aida, Y.	Involvement of Bovine Leukemia Virus Tax in Induction and Inhibition of Apoptosis.	Microbes Infect.			In press
Kuramitsu, M., Hashizume, C., Azuma, A., Kamata, M., 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
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
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+ T cells.	Virology	327	249-261	2004
Yamanishi, K., Pichl, L., Nitahara- Kasahara, Y., and Aida, Y.	Three dimensional space interaction model for HIV-1 accesory protein Vpr and membrane lipid molecules.	J. Three Dimensional Images	18	61-67	2004
増田 貴夫					
Kurihara, K., Harashima, N., Hanabuchi, S., Masuda, M., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Tomonaga, M., Ohashi, T., Hasegawa, A.,	Potential immunogenicity of adult T cell leukemia cells in vivo.	Int J Cancer			In press

Masuda, T. , Okamura, J., Tanaka, Y., and Kannagi, M.					
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	11563-11573	2004
Emori, Y., Ikeda, T., Ohashi, T., Masuda, T. , Kurimoto, T., Takei, M., and Kannagi, M.	Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by Z-100, an immunomodulator extracted from human-type tubercle bacilli, in macrophages.	J Gen Virol.	85	2603-2613	2004
Zhou, X., Kubo, M., Nishitsuji, H., Kurihara, K., Ikeda, T., Ohashi, T., Azuma, M., Masuda, T. , and Kannagi, M.	Inducible-costimulator-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in CD4(+) T lymphocytes.	Virology	325	252-263	2004
Nomura, M., Ohashi, T., Nishikawa, K., Nishitsuji, H., Kurihara, K., Hasegawa, A., Furuta, R.A., Fujisawa, J., Tanaka, Y., Hanabuchi, S., Harashima, N., Masuda, T. , and Kannagi, M.	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	3827-3836	2004
Nishitsuji, H., Ikeda, T., Miyoshi, H., Ohashi, T., Kannagi, M., and Masuda, T.	Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary	Microbes Infect.	6	76-85	2004

	non-dividing cells.				
Harashima, N., Kurihara, K., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Hanabuchi, S., Masuda, M., Ohashi, T., Fukui, F., Hasegawa, A., Masuda, T. , Takaue, Y., Okamura, J., and Kannagi, M.	Graft-versus-Tax response in adult T- cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation.	Cancer Res.	64	391-399	2004
生田 和良					
Kinomoto, M., Yokoyama, M., Sato, H., 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+ CD38+ T-lymphocyte subset.	Microbiol. Immunol.			In press
Kinomoto, M., Mukai, T., Li, Y.G., Iwabu, Y., Warachit, J.,	Enhancement of human immunodeficiency	Microbes Infect.	6	911-918	2004

Palacios, J.A., Ibrahim, M.S., Tsuji, S., Goto, T., and Ikuta, K.	virus type 1 infectivity by replacing the region including Env derived from defective particles with an ability to form particle-mediated syncytia in CD4+ T cells. <i>Microbes Infect.</i>				
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.	<i>J. Virol.</i>	78	8931-8934	2004
森川 裕子					
Morikawa, Y. , Goto, T., and Momose, F.	Human immunodeficiency virus type 1 Gag assembly through assembly intermediates.	<i>J. Biol. Chem.</i>	279	31964-31972	2004
Tomoda, H., Ohbayashi, N., Morikawa, Y. , Kumagai, H., and Omura, S.	Binding site for fungal b-lactose hyme-glusin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase.	<i>Biochim. Biophys. Acta</i>	1636	22-28	2004
足立 昭夫					
Wang, H., Sakurai, A., Khamsri, B., Uchiyama, T., Gu, H., Adachi, A. , and Fujita, M.	Unique characteristics of HIV-1 Vif expression.	<i>Microbes Infect.</i>			In press
Akari, H., Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A., Shehu--Xhilaga, M., Adachi, A. , and Strebel, K.	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	<i>J. Biol. Chem.</i>	279	12355-12362	2004

	processing site.				
Sugahara, F., Uchiyama, T., Watanabe, H., Shimazu, Y., Kuwayama, M., Fujii, Y., Kiyotani, K., Adachi, A. , Kohno, N., Yoshida, T., and Sakaguchi, T.	Paramyxovirus Sendai virus-like particle formation by expression of multiple viral proteins and acceleration of its release by C protein.	Virology	325	1-10	2004
Fujita, M., Akari, H., Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A.	Expression of HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation.	Microbes Infect.	6	791-798	2004
Sakurai, A., Jere, A., Yoshida, A., Yamada, T., Iwamoto, A., Adachi, A. , and Fujita, M.	Functional analysis of HIV-1 vif genes derived from Japanese long-term nonprogressors and progressors for AIDS.	Microbes Infect.	6	799-805	2004
Nagao, T., Yoshida, A., Sakurai, A., Piroozmand, A., Jere, A., Fujita, M., Uchiyama, T., and Adachi, A.	Determination of HIV-1 infectivity by lymphocytic cell lines with integrated luciferase gene.	International Journal of Molecular Medicine	14	1073-1076	2004
Jere, A., Piroozmand, A., Tripathy, S., Paranjape, R., Sakurai, A., Fujita, M., and Adachi, A.	Generation and characterization of HIV-1 clones chimeric for subtypes B and C nef.	International Journal of Molecular Medicine	14	1087-1090	2004
Piroozmand, A., Koyama, H.A., Shimada, Y., Fujita, M., Arakawa, T., and Adachi, A.	Role of Us3 gene of herpes simplex virus type 1 for resistance to interferon.	International Journal of Molecular Medicine	14	641-645	2004
明里 宏文					
Nguyen, K.L., Llano, M., Akari, H. , Miyagi, M., Poeschla, E.M., Strebel, K., and Bour, S.	Codon optimization of the HIV-1 vpu and vif genes stabilizes their messenger RNA and allows for highly efficient Rev-independent expression.	Virology	319	163-175	2004
Akari, H. , Fujita, M., Kao, S., Khan, M.A.,	High level expression of Human	J. Biol. Chem.	279	12355-12362	2004

Shehu-Xhilaga, M., Adachi, A., and Strebel, K.	immunodeficiency virus type 1 Vif inhibits viral infectivity by modulating proteolytic processing of Gag precursor at the p2/NC processing site.				
Fujita, M., Akari, H. , Sakurai, A., Yoshida, A., Chiba, T., Tanaka, K., Strebel, K., and Adachi, A.	Expression of the HIV-1 accessory protein Vif is controlled uniquely to be low and optimal by proteasome-degradation.	Microbes Infect.	6	791-798	2004
Uda, A., Tanabayashi, K., Yamada, K.Y., Akari, H. , Lee, Y.-J., Mukai, R., Terao, K., and Yamada, A.	Detection of 14 alleles derived from the MHC class I A locus in cynomolgus monkeys.	Immunogenetics	56	155-163	2004
増田 道明					
Ishii, T., Fujishiro, M., Masuda, M. , Goshima, Y., Kitamura, H., Teramoto, S., and Matsuse, T.	Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells.	Eur. Respir. J.	23	665-666	2004
Ishii, T., Fujishiro, M., Masuda, M. , Okudela, K., Kitamura, H., Teramoto, S., and Matsuse T.	Nutritional deficiency affects cell cycle status and viability in A549 cells: role of p27Kip1.	Cancer Lett.	213	99-109	2004
三隅 将吾					
Misumi, S. , Takamune, N., Ohtsubo, Y., Waniguchi, K., and Shoji, S.	Zn ²⁺ binding to cysteine-rich domain of extracellular human Immunodeficiency virus type-1 Tat protein is associated with Tat protein-induced apoptosis.	AIDS Res. Hum. Retrovir.	20	297-304	2004
Misumi, S. , Morikawa, Y., Tomonaga, M., Ohkuma, K., Takamune, N., and Shoji, S.	Blocking of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Virion Autolysis by Autologous p2gag Peptide.	J. Biochem.	135	447-453	2004