

4) ヒトではクラス I 領域とクラス III 領域の境界に位置する MIC-A および MIC-B 遺伝子の産物は、KLR 遺伝子群にコードされる NK 受容体に結合し、自然免疫にも関与しうる。アカゲザルでは MIC-1、MIC-2、MIC-3 の 3 遺伝子が機能的遺伝子として報告されている。アカゲザル MIC-1、MIC-2、MIC-3 の第 2 および第 3 エキソンをふくむゲノム断片を同時に増幅する PCR を考案して、その産物を RSCA で解析すると、個体あたり最大 4 種類の配列が得られることから、MIC 遺伝子座の個数は染色体あたり 3 個ではなく 2 個であると思われた。(図 3) さらに予備的知見であるが MHC クラス I ハプロタイプと連鎖不平衡が存在することが想定され、MIC 座位の多型も MHC 領域の個体差の一部として、個体の生体防御機構の多様性に寄与していると考えられた。(表 3)

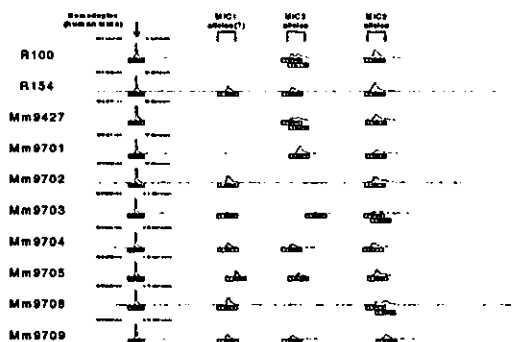


図 3 アカゲザル MIC 多型解析

| ハプロタイプ | Mamu-MIC-1 | Mamu-MIC-2 | Mamu-MIC-3 |
|--------|------------|------------|------------|
| a | - | *fast | *slow |
| b | *fast | *fast | - |
| g | *fast | *slow | - |
| j | *fast | *fast | - |

表 3 MIC 多型とクラス I ハプロタイプの連鎖不平衡

5) ヒト KIR 遺伝子群は HLA に匹敵する高度の多型が存在するとされており、型判定には比較的煩雑な手順を必要とする。我々は KIR 遺伝子群について RSCA を用いた簡便な型判定法を開発中であり、同法をアカゲザルの KIR 遺伝子群にも適

用可能かを検討した。予備的結果としてアカゲザルの KIR 遺伝子群のヒトと同様に遺伝子数の個体差があることが判明した。今後それぞれのピークに相当するゲノム DNA 断片をクローン化し、その塩基配列を明らかにして、多型情報を集積し、タイピング法の開発に資する計画である。

6) ヒトでは、第 6 番染色体長腕に MHC クラス I 様分子をコードする ULBP 遺伝子群が存在する。この遺伝子群の多型解析のために、遺伝子近傍のゲノム領域に存在する 4 ヶ所のマイクロサテライト多型を検出する PCR プライマーを設計し、家系の試料を用いて多型の分離を確認した。しかし、このプライマーではアカゲザルのゲノム DNA の増幅はできなかった。ULBP 遺伝子群はマウスにもそのオーソログが存在することから、アカゲザルでは遺伝子群の構成、多型の存在ともに未知であるが、進化的に保存されているゲノム構造を手がかりにして解明していく計画である。(図 4)

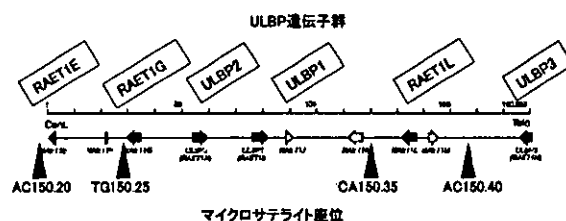


図 4 ヒト ULBP 遺伝子群とマイクロサテライト座位

D. 考察

1) アカゲザル MHC クラス I 領域の多型解析: Mamu-A、Mamu-B、MIC のそれぞれが多重遺伝子族を構成しており、特に Mamu-A、Mamu-B ではアレルの配列だけでなく、発現する遺伝子数に個体差があること、MIC は 3 種類の遺伝子が存在するが、おそらく MIC-1 と MIC-3 がアレリックな関係であり、染色体あたりの遺伝子数は 2 個であることが判明した。最近、このゲノム領域の塩基配列が明らかになり、クラス I 遺伝子の重複は 20 コピー近くにまでいたると報告されたが、

発現に関する知見は得られず、それに対して RSCA法を適用した cDNA 解析は現に発現している遺伝子数を容易にかつ的確に検出できるものである。今後、さらに発現遺伝子の配列情報を収集して、この旧世界ザルに特徴的な遺伝子構造の意味を分子進化学の観点から探る予定にしている。

以前の検討から、SIV 感染実験個体での SIV のエスケープ変異体の出現ならびに特定の SIVgag エピトープへの免疫応答性は特定の MHC ハプロタイプと共分離することが示され、少なくとも SIVgag207-216 に対する R90-120 由来の高応答性ハプロタイプと低応答性ハプロタイプには遺伝子数の大きな違いはないことから、免疫応答性はハプロタイプの保有する発現遺伝子の数によるものでなく、特定のハプロタイプ上の特定の MHC クラス I 分子によって担われることが示唆された。今後、さらに単一アレルを発現ベクターに組み込んで細胞に導入することでハプロタイプを構成する個々のアレルの機能を解明するための物的基盤整備を進めていく計画である。

一方、マイクロサテライトマーカーを併用することで、MHC 内での組み換え体の検出や、微量サンプルを用いて迅速に多型を確認するなどの応用が可能となった。

2) アカゲザル KIR ファミリーの構造解析: ヒト、アカゲザルとも KIR ファミリーが遺伝子数に個体差のある多重遺伝子族で構成されるが、ゲノム DNA について RSCA 法を用いることで構造多型が比較的簡便に解析可能である。しかし高精度タイピングにはさらに多くの情報収集を要する。

3) ULBP 遺伝子群の多型解析: ヒト ULBP 遺伝子群は、MHC 領域外に存在するが、構造、機能ともに MHC クラス I に類似する。ULBP はサイトメガロウイルス UL16 タンパクに結合する細胞因子として同定されたものであり、多型の存在が報告されているが、その機能的意味については今後の研究課題である。マイクロサテライトマ-

カーによる多型解析法を開発できたので、この方法を用いて、ヒト集団での感染抵抗性、疾患感受性の遺伝学的解析を進める計画である。アカゲザルについては、同方法がそのままでは適用できず、遺伝子単離などを行ない、それによって得られる配列情報にもとづいて解析方法を考案する必要がある。

E. 結論

RSCA 法を応用したアカゲザル MHC クラス I 遺伝子群の多型解析法により、クラス I 遺伝子のハプロタイプ構成を明らかにするとともに、同法を各個体のハプロタイプのタイピングに適用した。SIV ワクチン実験に供される個体群と繁殖コロニーのブリーダーに比較的高頻度に見られる、16 種のハプロタイプを同定でき、それらを構成するアレルの塩基配列を明らかにした。さらに、MIC 遺伝子座とマイクロサテライト座位の多型解析から、より迅速かつ確実なタイピング法を開発する基礎を得た。また、KIR、ULBP など NK 細胞の認識に関わる遺伝子群について、宿主の感染抵抗性や免疫応答性を規定する遺伝要因の解明に応用可能な多型検出法の開発に着手した。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y: Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial, *J. Exp. Med.* 199: 1709-1718, 2004.

2. 学会発表

1) 高橋（田中）弓子、安波道郎、保富康宏、森一泰、俣野哲朗、宮澤正顕、本多三男、木村彰方：
アカゲザル MHC クラス I 遺伝子群の多型解析。第
49 回日本人類遺伝学会大会、東京、平成 16 年 10
月

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

ワクチン効果判定モデル系の確立と SIV 感染抵抗性遺伝子 同定のためのアカゲサル MHC クラス II 遺伝子の解析

分担研究者 宮澤 正 顯（近畿大学医学部 教授）

研究協力者 北口 大輔（近畿大学医学部 免疫学教室 研究員）

研究協力者 湯浅 貴恵（近畿大学大学院医学研究科 ハイテクリサーチセンター ポストドクター）

研究要旨 我々はこれまでに、わが国で交配・維持され、サル免疫不全症候群ウイルス(SIV)の感染実験、ワクチン開発実験などに用いられているアカゲサル個体について、その MHC class II 遺伝子型を網羅的に決定し、DRB 遺伝子座の多重性とハプロタイプ構成を解明してきた。今年度は、更に多くの個体についてその DRB 遺伝子型とハプロタイプ構成を解明するとともに、これまで世界的にも解析が進んでいなかった DP および DQ 遺伝子座の対立遺伝子型決定法を開発した。これにより、特にラオス系のアカゲサルに、これまで報告されてきたものとは異なる DP, DQ 遺伝子座の対立遺伝子が多数存在する可能性が示された。

A. 研究目的

HIV 感染の予防や免疫学的治療のモデルとして、アカゲサルの SIV 感染系は極めて有用である。しかしながら、免疫学的研究対象としてのアカゲサルには、その MHC タイピングが十分でないという問題点があった。ウイルス抗原に対する宿主 T リンパ球の応答能は MHC 遺伝子群によって厳密な制御を受けており、細胞傷害性 T リンパ球活性化やウイルス中和抗体産生誘導の鍵を握る CD4 陽性ヘルパー T 細胞による抗原認識は、MHC class II 遺伝子産物の構造に完全に依存している。従って、ワクチン開発を意図とした感染防御実験を行う際、対象個体群の MHC 遺伝子型が決定されていることは、採り上げようとするウイルス抗原に対するリンパ球反応性を保証するという点で、最低条件となる。また、HIV 感染ヒト集団の遺伝疫学的解析により、MHC 遺伝子型、特にそのヘテロ接合性とエイズ発症遅延との相関が指摘されている。アカゲサルにおいても、SIV 感染に対する自然抵抗性と MHC 遺伝子型の相関が考えられ、それを示唆する実験結果が報告されている。

アカゲサルの MHC class II 遺伝子座、特に DRB 座が多重性に富み、同一染色体上に発現可能な複数の遺伝子が存在して、極めて多様なハプロタイプを構成していることは周知の事実である。このことは、単に免疫遺伝学的に興味深いばかりでなく、ヒトを含む霊長類の進化における、感染抵抗性による選択を考える上でも重要である。そこで本研究では、我が国で感染実験に用いられているアカゲサル個

体群の MHC class II 遺伝子型とそのハプロタイプ構成を、網羅的に解析することを目標とした。

また、これまでに共同研究者の森らが行ってきた、SIV 遺伝子産物上の T リンパ球認識エピトープの解析で、DRB 遺伝子型を共有する個体でも T 細胞認識エピトープが異なる例が知られており、DP または DQ 分子により提示される SIV エピトープが存在する可能性が高い。そこで本年度は、従来から推進してきた DRB 遺伝子座の多型性・多重性の解析に加え、世界的にも遺伝子型の登録数がまだ少ない、DP, DQ 遺伝子座の解析も開始した。

B. 研究方法

1) 対象個体

国立感染症研究所エイズ研究センター及び筑波医学実験用霊長類センターで SIV 感染実験に用いられ、感染抵抗性の有無や SIV 感染後の免疫応答能が既にある程度解析されているアカゲサル個体と、それらの親個体、および今後実験に用いられる予定の個体群を解析対象とした。これら複数の個体から樹立された B リンパ芽球株(BLCL)より、総 RNA を抽出後、オリゴ dT プライマーを用いて高忠実度の逆転写反応を行い、得られた cDNA を以下の解析に用いた。

2) DRB 遺伝子多型とハプロタイプ構成の解析

各細胞株由来 cDNA をテンプレートとし、既知のアカゲサル MHC class II 対立遺伝子の塩基配列情報を参考にして設計した、DRB 対立遺伝子群に

特異的なプライマーペアを用いて、cDNA 全長の PCR 増幅を行った。得られた PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動でそのサイズを確認するとともに、プライマー中に設置した制限酵素切断部位を用いて、pUC19 プラスミドへのクローニングを行い、各クローンの塩基配列を決定した。

DRB については、同一染色体上に複数の遺伝子座が存在し、ハプロタイプを形成していることが知られている。そこで、各個体で発現する DRB 対立遺伝子の数を明らかにし、同時に親子関係の明確な個体間での DRB 対立遺伝子共有の状況を明らかにするため、特に多型性に富む exon 2 の増幅産物について、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (Denaturing gradient gel electrophoresis: DGGE) による解析を行った。この目的のため 3' 側に GC クランプを付加した DRB exon 2 特異的なプライマーペアを設計し、PCR 反応および電気泳動の条件を検討して、多数個体の検体を同時解析できる実験方法を確立した。さらに、DGGEゲルから各バンドを切り出して TOPO-TA プラスミドベクターにクローニングし、バンド毎の塩基配列を決定、全長クローニングにより決定された対立遺伝子型との対比を行って、各個体で発現する全ての DRB 対立遺伝子を網羅できるように心掛けた。

3) DP および DQ 遺伝子座対立遺伝子の解析

同じアカゲザル MHC class II 遺伝子群にあっても、DP および DQ 分子の遺伝子については、これまで世界的に解析が進んでいない。従って、本研究で DRB 遺伝子型の多型性解析に用いてきた、既存の塩基配列情報に基づく PCR プライマーの設計は、DP および DQ 分子には適用不可能である。そこで、多少とも塩基配列データの報告がある DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子座の exon 2 の配列を元に、

cDNA の 5' 側および 3' 側を伸長させるプライマーを設計し、複数個体の全 RNA を鋳型に、RACE 法による増幅と塩基配列決定を行った。得られた cDNA 5' および 3' 配列を元に、複数の対立遺伝子で保存性の高い塩基配列を抽出して、DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子産物全長を増幅できる PCR プライマーを設計した。

これら新規設計プライマーを用いて増幅した DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子の全長発現産物は、プラスミドベクターに組換え、それぞれ複数クローンでその塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

本研究はアカゲザルの遺伝子解析に関するものであり、動物からの採血は、疼痛の防止に配慮し、動物愛護の精神に則り行った。

C. 研究結果

1) 新規個体の DRB 遺伝子型解析

昨年度までに確立した DRB cDNA の増幅とクローニング法、および DGGE 法とゲルバンドのクローニングを駆使し、今年度は更にミャンマー系 7 個体、ラオス系 1 個体の DRB 遺伝子型とハプロタイプ構成を決定した。また、昨年度までの解析で、その遺伝子型が親個体のハプロタイプから予想されるものとは異なっていた一個体 (個体番号 0004) について、その DRB cDNA クローンを更に多数分離し、それらの塩基配列を決定した。その結果、この個体の持つ DRB 遺伝子型は、明らかに親個体の遺伝子型から予想されるものとは異なることが確認された。

2) RACE 法による DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子 5'-および 3'-末端領域解析と、遺伝子型決定
これまでに少数例の exon 2 塩基配列が報告され

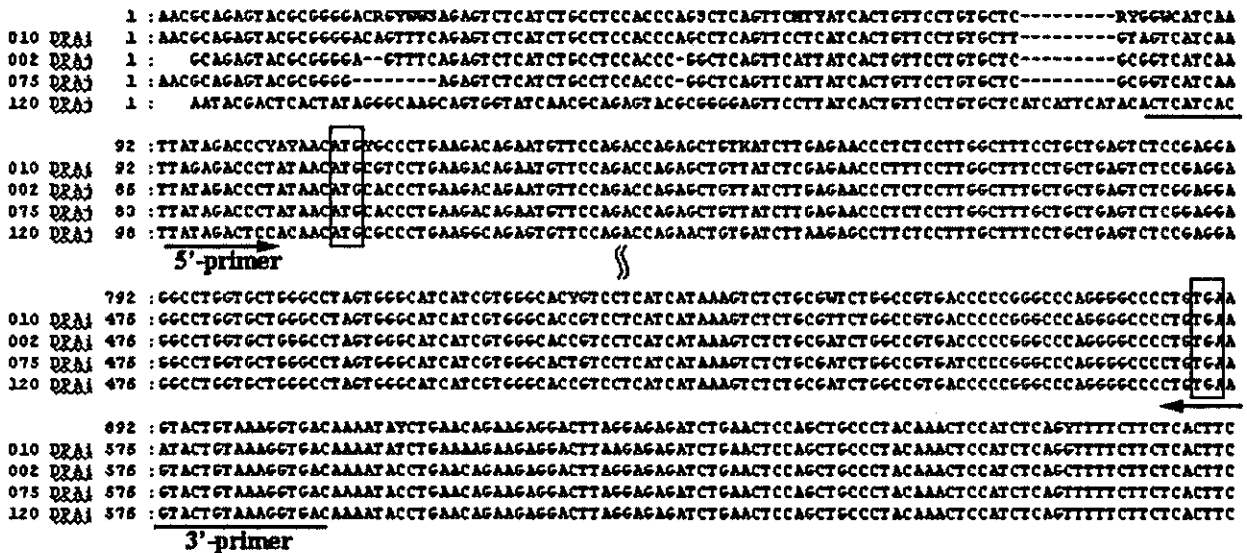


図 1. RACE 法による DPA 遺伝子産物 exon 2 の上流域および下流域の解析。複数個体からの遺伝子産物で、開始・終止コドンを含む部位までの塩基配列を決定し、保存性の高い配列を見出した。

ている DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子について、exon 2 塩基配列中の比較的保存性が高い部分にプライマーを設計し、これまで解析に用いてきたミャンマー系およびラオス系の、それぞれ複数個体の全 RNA を鋳型に、RACE 法によって cDNA の 5'-および 3'-末端配列を決定した(図1に、DPA 遺伝子産物を例として示す)。その結果、開始コドンと終止コドンを含む、DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子産物全長の塩基配列を確認することが出来た。

得られた各遺伝子産物全長の塩基配列を詳細に解析した結果、それぞれ複数個体由来の遺伝子産物で、互いの塩基配列が高度に保存された領域がタンパク質コード領域の外に見出されたので、各遺伝子産物について、そのタンパク質コード領域全長を増幅できる PCR プライマーを設計した。こうして設計したプライマーを用い、各個体の cDNA を鋳型に PCR 反応を行ったところ、それぞれの遺伝子について、予想されるサイズの DNA 断片が増幅された(図2)。

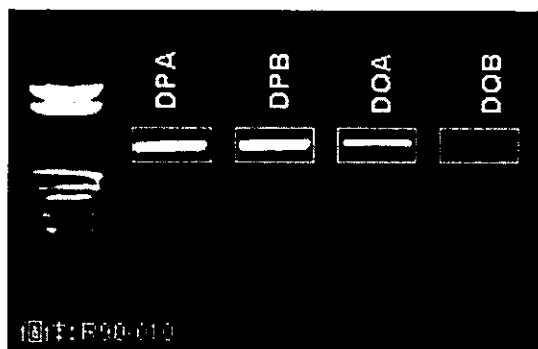


図 2. 新規設計プライマーを用いた、DPA, DPB, DQA, DQB 各全長発現産物の増幅

設計したプライマーには両端に制限酵素切断部位が設置してあるので、これら増幅産物をプラスミドベクターにクローニングし、その塩基配列を決定した。それぞれの遺伝子産物について複数のクローンで塩基配列を解析し、DRB 遺伝子と同様、同一の塩基配列が多数確認された場合に、そのアレルが発現しているものと見なした。

| 個体名 | 分子 | 頻度 | アレル | 相同性 |
|---------|-------|-----------|-----------|------|
| R90-010 | DPA | 10/10 | DPA*0201 | 100% |
| | DPB | 16/16 | DPB1*06 | 100% |
| | DQA | 13/13 | DQA1*0108 | 100% |
| | DQB | 10/32 | DQB1*0608 | 100% |
| 22/32 | | DQB1*0607 | 100% | |
| R89-075 | DPA | 15/21 | DPA*0101 | 96% |
| | | 6/21 | DPA*0201 | 97% |
| | DPB | 10/15 | DPB1*14 | 98% |
| | | 5/15 | DPB1*13 | 93% |
| | DQA | 4/17 | DQA1*0108 | 100% |
| | | 13/17 | DQA1*10 | 96% |
| DQB | 11/16 | DQB1*0608 | 100% | |
| | 5/16 | DQB1*0607 | 100% | |

これまでに解析したミャンマー系およびラオス系の親個体に関して、それらで見出された DP, DQ 分子の対立遺伝子を表に纏めて示す。ミャンマー系の親個体である R90-010 で見出された DPA, DPB, DQA, DQB のアレルは、これまでにデータベース上に報告されているアレルと同一であった。ここで、表に示す既報告アレルとの相同性(%)は、データベースに多数の報告がある exon 2 の塩基配列に関するものであるが、実際には、exon 2 塩基配列は既報告アレルと100%一致するが、exon 2 以外の部分で塩基配列に多型が認められるものもあった。

一方、ラオス系の親個体である R89-075 では、DQA, DQB の発現産物は既報告のアレルと一致するものが多かった。しかし、DPA, DPB の exon 2 塩基配列は、何れも既報告アレルと異なっており、最大でも97%程度の相同性であった。また、DQA の発現産物についても、検出された二つのアレルの産物のうち一つは、既報告のアレルとは異なる塩基配列を持っていた。

D. 考察

我が国で SIV 感染実験などに用いられているアカゲザルの MHC class II 分子の遺伝子型と、その発現多重性を網羅的に解析し、これまで未報告の対立遺伝子多数を記載・登録すると共に、ハプロタイプ構成を明らかにしてきた。今年度は、更に多数の個体についてその DRB 遺伝子型とハプロタイプ構成を明らかにするとともに、新たに DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子の全長発現産物を解析する方法を確立し、ミャンマー系およびラオス系親個体の遺伝子型を解析した。その結果、ラオス系ではこれまで未報告の DPA, DPB および DQA アレルを発見した。

遺伝子資源という観点からは、これまで欧米の研究グループにより報告されてきたものとは全く異なる DRB ハプロタイプと DP, DQ 対立遺伝子の集積が見られるラオス系のアカゲザルは貴重であり、この遺伝的資源の積極的な保護と、これら個体の免疫学的特徴の解析が望まれる。また、森らの解析により、DRB 遺伝子型は一致するのに T 細胞が認識する SIV 抗原エピトープが異なる個体の存在が示唆されており、今後 DP および DQ 分子によって提示される抗原ペプチドの解析が重要である。今回我々が確立した DP, DQ 分子クローニング法では、DPA, DPB, DQA, DQB 各遺伝子の発現産物全長を、両端に制限酵素切断部位を含む形で取り出しており、発現ベクターへの移植が容易である。来年度以降、これら新規分子の発現系による機能解析を、共同して進めたい。

E. 結論

我が国で SIV 感染実験に用いられているアカゲザル個体、およびそれらの親個体と、今後実験に

利用予定の個体群が発現する MHC class II 対立遺伝子を網羅的に同定し、親子関係から予想されるハプロタイプ構成を明らかにした。今年度は特に、これまで世界的にも解析の進んでいなかった DP および DQ 分子の cDNA を全長にわたってクローニングし、解析する手法を確立した。これにより、今後特定のクラス II ハプロタイプと SIV 感染抵抗性、或いは感染防御ワクチンの有効性の関係が、より容易に解析出来ると期待される。

遺伝的資源保護の観点から、ラオス系アカゲザルの MHC class II 遺伝子は貴重な存在であり、今後ミャンマー系との交雑を避けつつ、慎重に維持して行くことが求められる。

F. 健康危険情報 該当するもの無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kanari, Y., M. Clerici, H. Abe, H. Kawabata, D. Trabattoni, S. Lo Caputo, F. Mazzotta, H. Fujisawa, A. Niwa, C. Ishihara, Y. A. Takei, and M. Miyazawa. Genotypes at chromosome 22q12-13 are associated with HIV-1-exposed but uninfected status in Italians. *AIDS: in press*, 2005.

2) Miyazawa, M. Host genes that influence immune and non-immune resistance mechanisms against retroviral infections. *Recent Res. Devel. Virol.* 6:105-118, 2004.

3) Miyazawa, M., E. Kajiwara, N. Tabata, T. Ogawa, T. Yuasa, and H. Matsumura. Pathogenicity of autoantibodies reactive with the endogenous retroviral envelope glycoprotein gp70. *In From Animal Models to Human Genetics: Research on the Induction and Pathogenicity of Autoantibodies* (K. Conrad, *et al.*, editors). Pabst Science Publishers, Lengerich, 2004. pp85-96.

4) Matano, T., M. Kobayashi, H. Igarashi, A. Takeda, H. Nakamura, M. Kano, C. Sugimoto, K. Mori, A. Iida, T. Hirata, M. Hasegawa, T. Yuasa, M. Miyazawa, Y. Takahashi, M. Yasunami, A. Kimura, D. H. O'Connor, D. I. Watkins, and Y. Nagai. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian

immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J. Exp. Med.* 199: 1709-1718, 2004.

5) Sugahara, D., S. Tsuji-Kawahara, and M. Miyazawa. Identification of a protective CD4⁺ T-cell epitope in p15^{gag} of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting to the plasma membrane in immunogenicity. *J. Virol.* 78: 6322-6334, 2004.

6) Tahara H., N. Iwanami, N. Tabata, H. Matsumura, T. Matsuura, T. Kurita, and M. Miyazawa. Both T and non-T cells with proliferating potentials are effective in inducing suppression of allograft responses by alloantigen-specific intravenous presensitization combined with suboptimal doses of 15-deoxyspergualin. *Transplant. Immunol.* 13:25-32, 2004.

2. 学会発表

1) Miyazawa, M. Special lecture: Genetic basis for resistance against retroviral infections – from mouse models to humans. **Third International Workshop on Immunology and Infectious Diseases.** Naples, June 8-10, 2004.

2) Kanari, Y., M. Clerici, H. Abe, H. Kawabata, D. Trabattoni, S. Lo Caputo, F. Mazzotta, H. Fujisawa, A. Niwa, C. Ishihara, Y. A. Takei, and M. Miyazawa. Genetic background of HIV-specific immune responses in HIV-exposed but uninfected: chromosome 22q13 is associated with anti-HIV immune responses. **XV International AIDS Conference.** Bangkok, July 11-16, 2004.

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許出願

1) Miyazawa, M., M. Clerici, and S. Irie, inventors. **Resistance Genes:** Supplementary Patent Application to PCT/GB2003/004493 (Filed December 23, 2004).

2) 宮澤正顯、阿部弘之: 新規ヒト内在性レトロウイルス HC2 の env 遺伝子. 特願 2004-231412, 2004

厚生労働科学研究費補助金（創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

抗原提示を効率よく行う新規ワクチンの開発に関する研究

分担研究者 保富康宏 三重大学医学部 助教授

エイズウイルスの env における糖鎖結合は宿主の免疫系からの回避の一つと考えられ、この糖鎖結合部位を取り除いた SIV(d5G)は生体内で増殖せず、野生型 SIV(WT)に対しワクチン効果をもたらす。本研究では WT と d5G の env の発現ならびに免疫系への認識をマウスを用いて検討した。WT および d5G 組み込みワクシニアウイルスを細胞株に感染させると d5G の env の発現は WT に比べ感染細胞中に早期に認められ、さらに d5G env 蛋白は感染細胞の膜に近く発現されていた。宿主の免疫反応におけるものでは d5G の env 抗原はより大量に提示されることが示唆された。また、マウスにおける細胞傷害性 T リンパ球(CTL)のエピトープを検討したところ d5G では誘導されるが、WT では誘導されないエピトープが見つかり抗原提示に差があることが示された。

A.研究目的

エイズウイルスは種々の機構により宿主の免疫監視機構より回避し、そのことが慢性感染症となる一つの原因であると考えられている。env における糖鎖結合部位の存在もその一つと考えられ、この糖鎖結合部位を取り除いた SIV は生体内で増殖せず、野生型 SIV に対しワクチン効果をもたらす。このことから、この env の糖鎖結合部位の意味を知ることが将来のワクチン開発や病態解明において重要と考えられる。本研究では糖鎖結合部位の存在意義を知るために、マウスを用い、この糖鎖結合部位を除去した d5G ならびに野生型 WT において env 抗原の発現と誘導される免疫反応を比較、検討した。

B.研究方法

1) 野生型 SIVenv(WT) および SIV5Genv(d5G)をプラスミド(pJW)に組み込み DNA ワクチンを作製した。

2) DNA ワクチンを BALB/C x C57BL/6 F1 (CB6F1)マウス筋肉内に electroporation 法を用いて筋肉内に 1 週間隔で 3 回免疫した。

3) 免疫マウスの脾細胞の CD8+細胞を in vitro で SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクシニアウイルスで刺激した後 ELISPOT assay にてインターフェロン γ (IFN- γ)産生細胞を測定した。

3) 免疫マウスの脾細胞を用い野生型 SIVenv および SIVd5Genv 組み込みワクシニアウイルスを感染させ、マイトマイシン処理をした同型脾細胞を刺激細胞として細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)の誘導を測定した。

4) SIVenv のアミノ酸 25mer を 13 オーバーラップさせ 42 個のアミノ酸を作成し、CTL エピトープの検索を行った。

5) ウイルス抗原の発現は SIV env 特異的抗体を用いた FACS 分析で行った。

(倫理面への配慮)

本実験はマウスを用いた実験であり、わが国の関連法規及び三重大学医学部共同研究施設・実験動物共同研究室内の規約を遵守し、疼痛の防止に配慮しつつ、動物愛護の精神に則って行った。動物実験の実施については、三重大学医学部動物実験委員会の許可を得た。

C. 研究結果

1. SIV env 蛋白の細胞内発現：SIV env WT および d5G 組み込みワクシニアウイルス感染細胞において細胞表面への発現を比較したところ d5G の方が早期に大量に発現していた(Fig. 1a,b)。しかしながら細胞内の発現は両者に差は認められなかった(Fig. 1c)。

2. HIV 特異的免疫反応：免疫マウスに SIV env WT および d5G 組み込みワクシニアウイルスを接種したところ d5G 免疫マウスがいずれのウイルスに対しても *in vivo* で WT 免疫に比べ高い抗ウイルス効果を誘導した(Fig. 2)。免疫マウスの脾細胞からの CD8⁺細胞を組み合わせワクシニアウイルスで刺激し γ -IFN 産生細胞を ELISPOT assay で調べたところ d5G 免疫マウス細胞を d5G 組み込みワクシニアウイルスで刺激した時が最も高い値を示した(Fig. 3a)。しかしながら SIV env に対する抗体産生は両免疫群に差は無く、中和活性も示さなかった(Fig. 3b, Table 1)。

免疫マウスの脾細胞から特異的 CTL を誘導する際に、免疫、*in vitro* での刺激、標的細胞の標識にそれぞれ WT と d5G を用い全ての組み合わせにおいて CTL の誘導を試みたところ、免疫、刺激、標的のいずれにおいても d5G は WT に比べ高い CTL 活性を誘導した(Fig. 4)。オーバーラッピングペプチドで得られたエピトープに対する CTL 活性では aa.205-229 領域は d5G 免疫でのみ誘導

され標的細胞を WT 組み込みワクシニアウイルス感染細胞とした時も aa.205-229 刺激で誘導した CTL は細胞障害活性を示さず、d5G と WT では抗原提示に差があることが認められた (Fig.5)。

D. 考察

ウイルスの宿主からの免疫回避機構は種々知られており、エイズウイルスでは数多くの回避機構の存在が報告されている。糖鎖結合部位はその中の一つの機構ではないかと考えられており、当初は中和抗体の誘導や結合阻害に働いているのではないかと考えられていた。しかしながらその後の検討では抗体に関する明確な結果は示されず、我々の実験でも抗体における糖鎖結合部位の意義は見出されなかった。このことより細胞性免疫の関与が考えられ、本報告のように感染細胞における抗原提示に差が見出された。ウイルスの変異により抗原提示が低下または消失するという報告はあるが、今回のように WT では抗原提示が認められず、糖鎖結合部位の除去によって発現するという報告は見られない。このことは env 蛋白の合成が細胞膜近傍で起きていることが関与している可能性があり、現在検討している。

E. 結論

SIV の env における糖鎖結合部位を置換した d5G では env 蛋白の合成が膜近傍で起これ、WT では見られない CTL エピトープが提示されることが示された。

F. 健康危険情報

該当するもの無し

G.研究発表

1. 論文発表

1) Takamura,S., Niikura,M., Li,T.C., Takeda,N., Kusagawa,S., Takebe,Y., Miyamura,T., and Yasutomi,Y. DNA vaccine-encapsulated virus-like particles derived from an orally transmissible virus stimulates mucosal and systemic immune responses by oral administration. *Gene Ther.*2004;11:628-635.

2)Takamura,S., Matsuo,K., Takebe,Y., and Yasutomi,Y. Ag85B of mycobacteria elicits effective cytotoxic T lymphocyte responses through activation of robust Th1 immunity as a novel adjuvant in DNA vaccine.(submitted)

3) 保富康宏.ウイルス用中空粒子 (VLP) を用いた経口ワクチン.臨床とウイルス 2004;32 : 362-371.

2. 学会発表

1) Oral administration of vaccine by using virus-like particle derived from orally transmissible virus. : Yasutomi,Y.・・・Fourth World Congress on Vaccine and Immunization. 2004年、シンポジウム

2) Induction of effective cytotoxic T lymphocyte responses using helper T cell determinant peptide of α antigen from mycobacteria in peptide vaccine constructs.:Yasutomi,Y.・・・Fourth World Congress on Vaccine and Immunization. 2004年、ワークショップ

3) 経口感染ウイルスのウイルス様中空粒子 (VLP) を利用した経口エイズワクチンの開発：保富康宏・・・第8回ワクチン学会

学術集会、シンポジウム

4) M 蛋白欠損パラインフルエンザ 2 型ウイルス (PIV2) およびマウス IL-4 を挿入した PIV2 の性状解析：河野光男、保富康宏、高村史記、垣内雅彦、駒田洋、鶴留雅人、伊藤守弘、西尾真知子、伊藤康彦・・・第52回日本ウイルス学会学術集会

5) DNA ワクチン封入キメラ VLP 経口投与による粘膜誘導ワクチンの試み：高村史記、新倉昌浩、横田恭子、李天成、武田直和、宮村達男、保富康宏・・・第52回日本ウイルス学会学術集会

H.知的財産権の出願・登録状況

1) α 抗原のワクチンにおけるアジュバント剤としての利用 (出願中、特開 2002-114708)

2) α 抗原のアレルギー性疾患治療剤としての利用 (出願中、PCT/JP/01459)

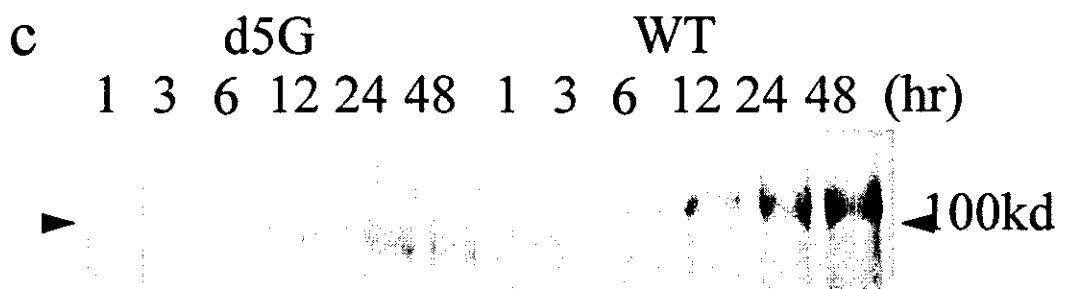
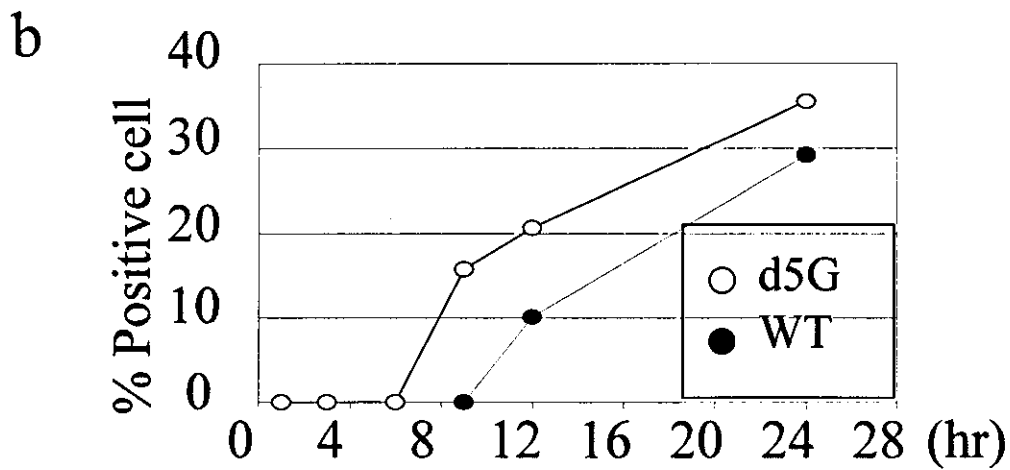
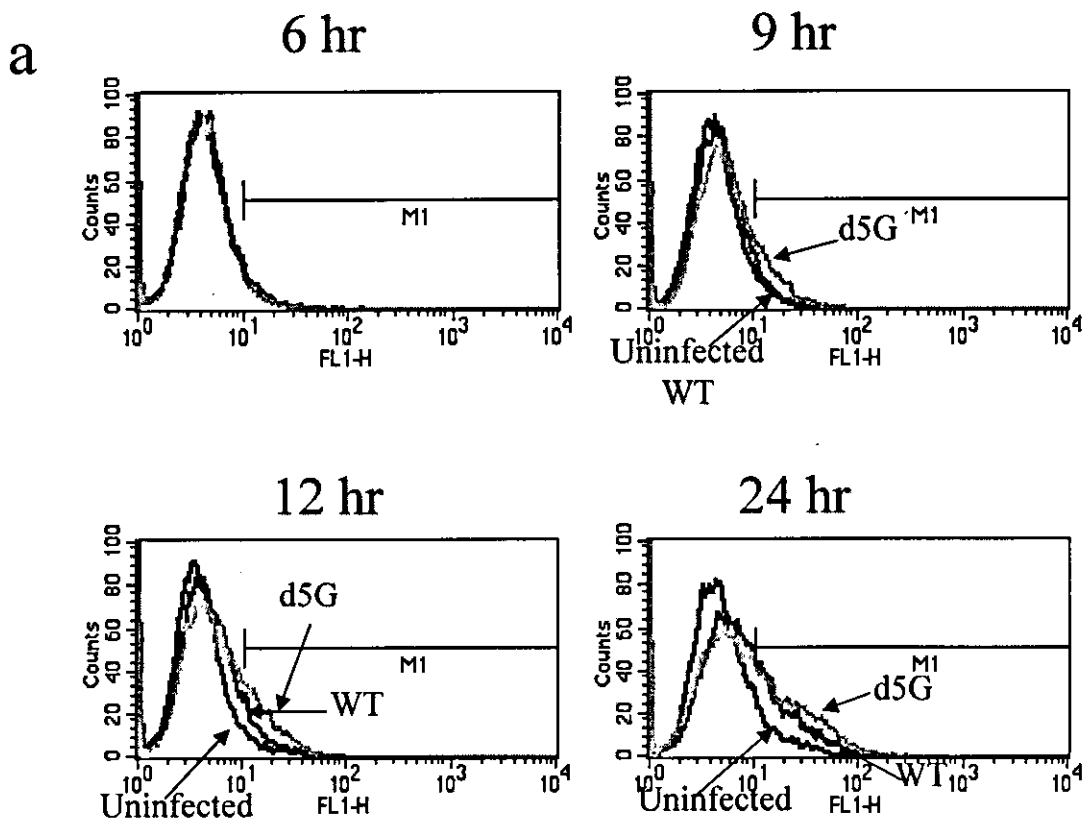


Fig. 1 SIVenvの細胞での発現

SIVenvの細胞表面での発現をFacsにて測定(a,b)ならびに細胞全体での発現をウェスタンブロットで経時的に測定した。

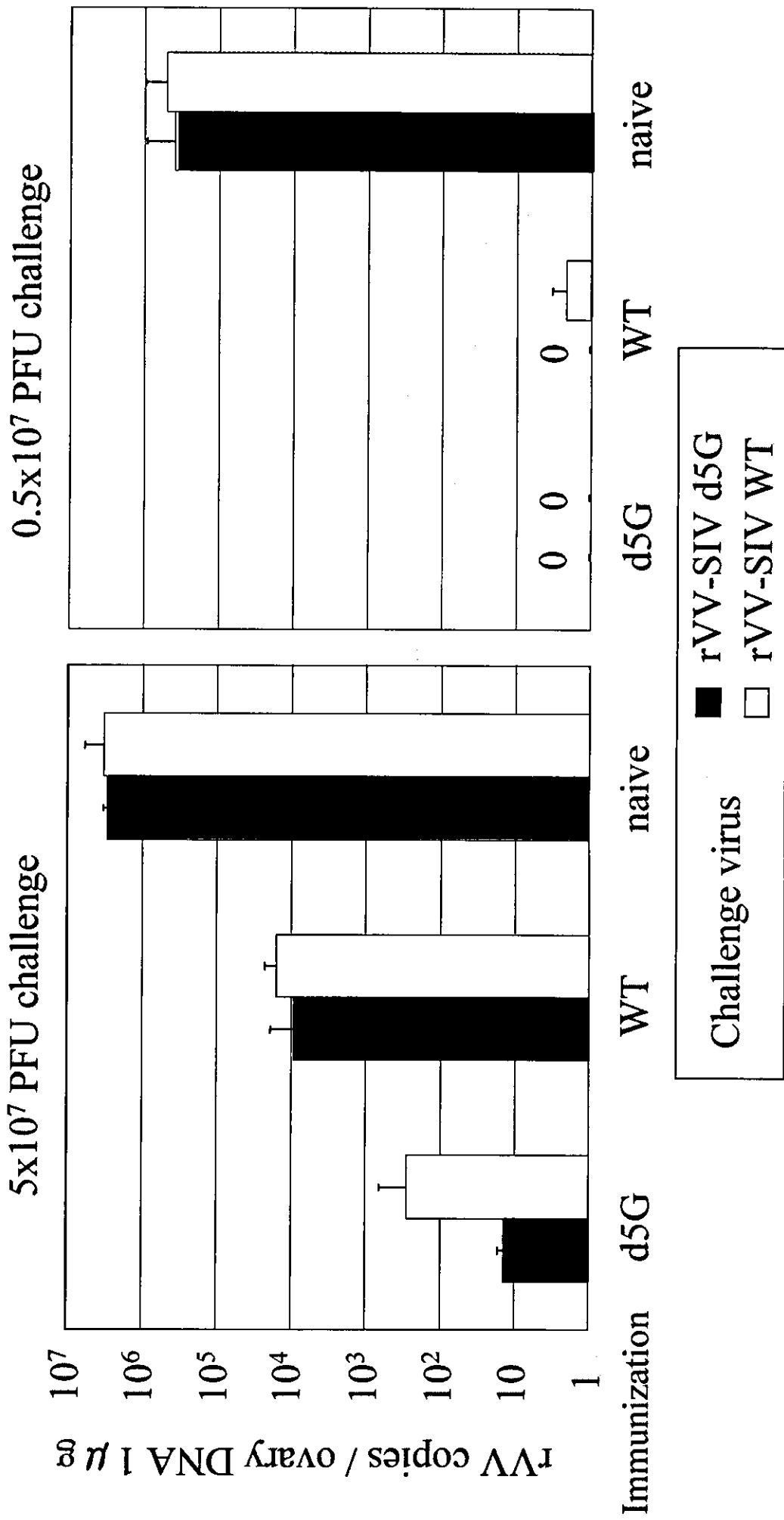


Fig. 2 d5GおよびWT env DNAワクチン免疫マウスのin vivoでの抗ウイルス活性
 マウスにd5GまたはWT env DNAワクチンを接種し、d5GまたはWT env組み込みワクシニアウイルスをチャレンジし、チャレンジ後5日目での卵
 巣におけるワクシニアウイルスをRT-PCRで測定した。

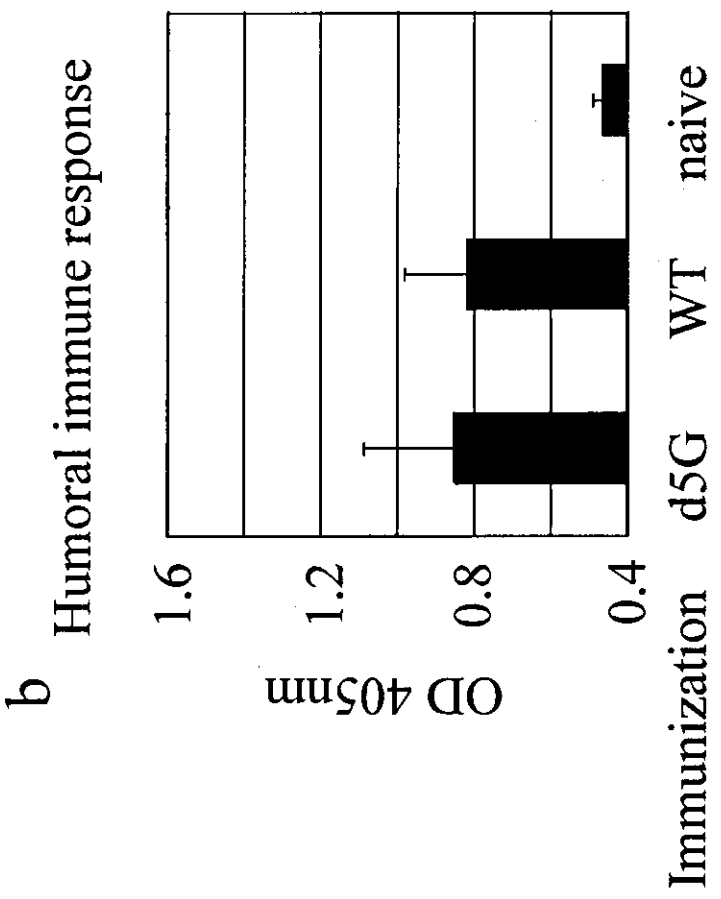
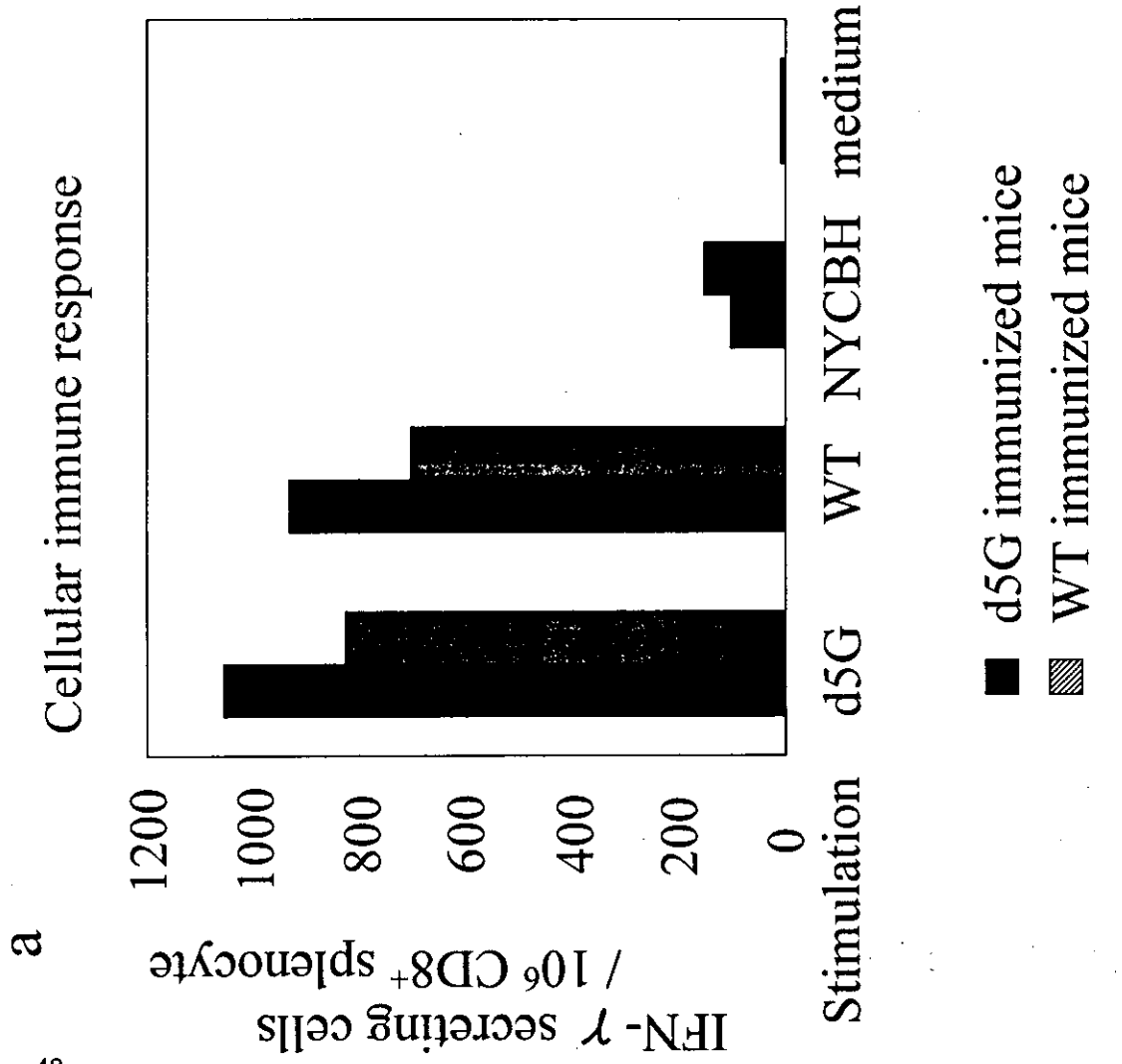


Table 1

| Immunization | Neutralization Ab titer |
|--------------|-------------------------|
| d5G | < 20 |
| WT | < 20 |

Fig. 3 d5GおよびWT DNAワクチン免疫マウスにおける特異的ELISPOTと抗体誘導免疫マウスの脾細胞のCD8⁺細胞におけるd5GおよびWT特異的IFN- γ 産生細胞(a)と特異抗体のELISAによる測定(b)

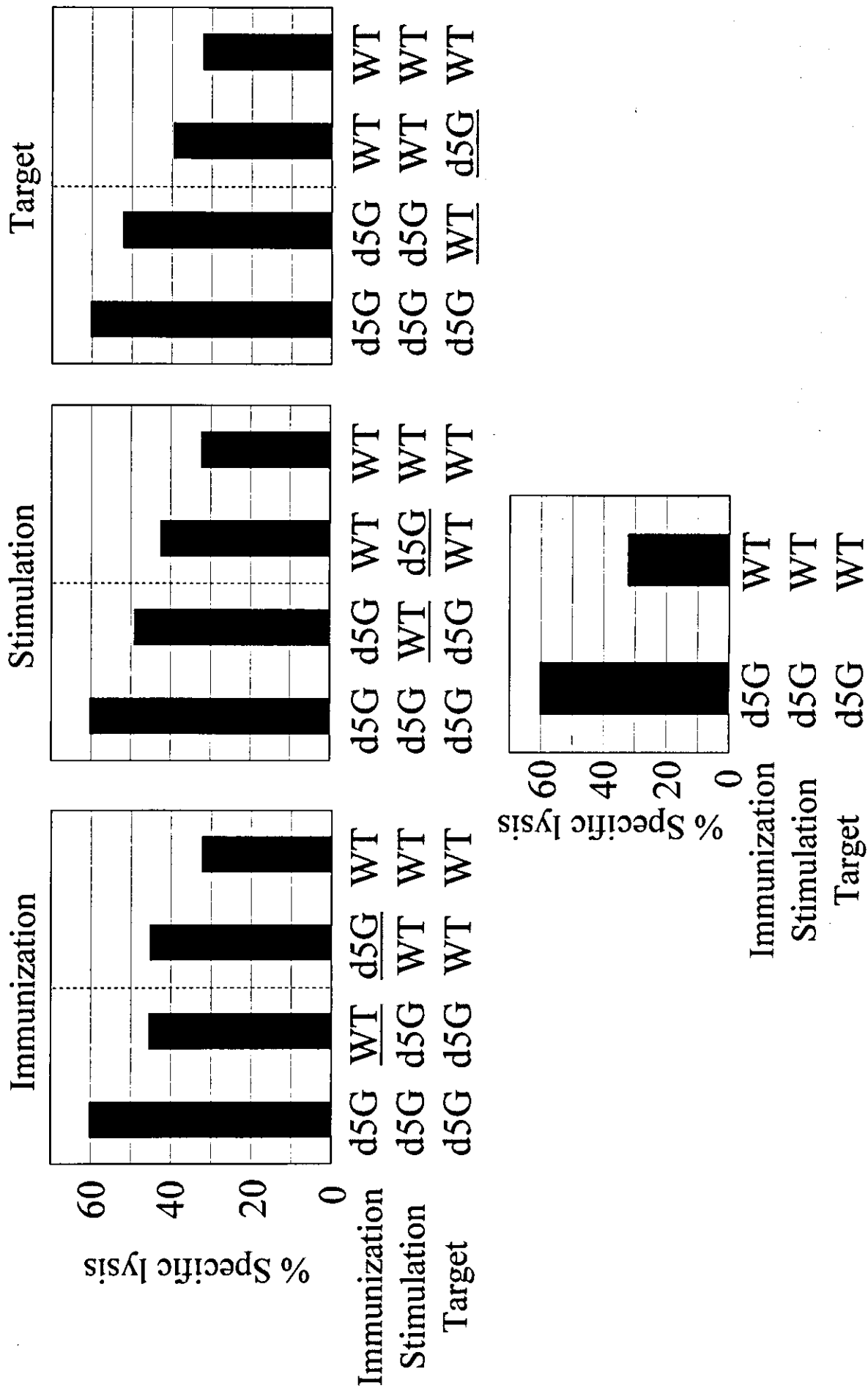


Fig. 4 DNAワクチン免疫マウスにおけるCTLの誘導
 免疫、刺激、標的を各々d5GおよびWTの組み合わせにて免疫マウスの脾細胞で誘導されるCTL活性を比較した。

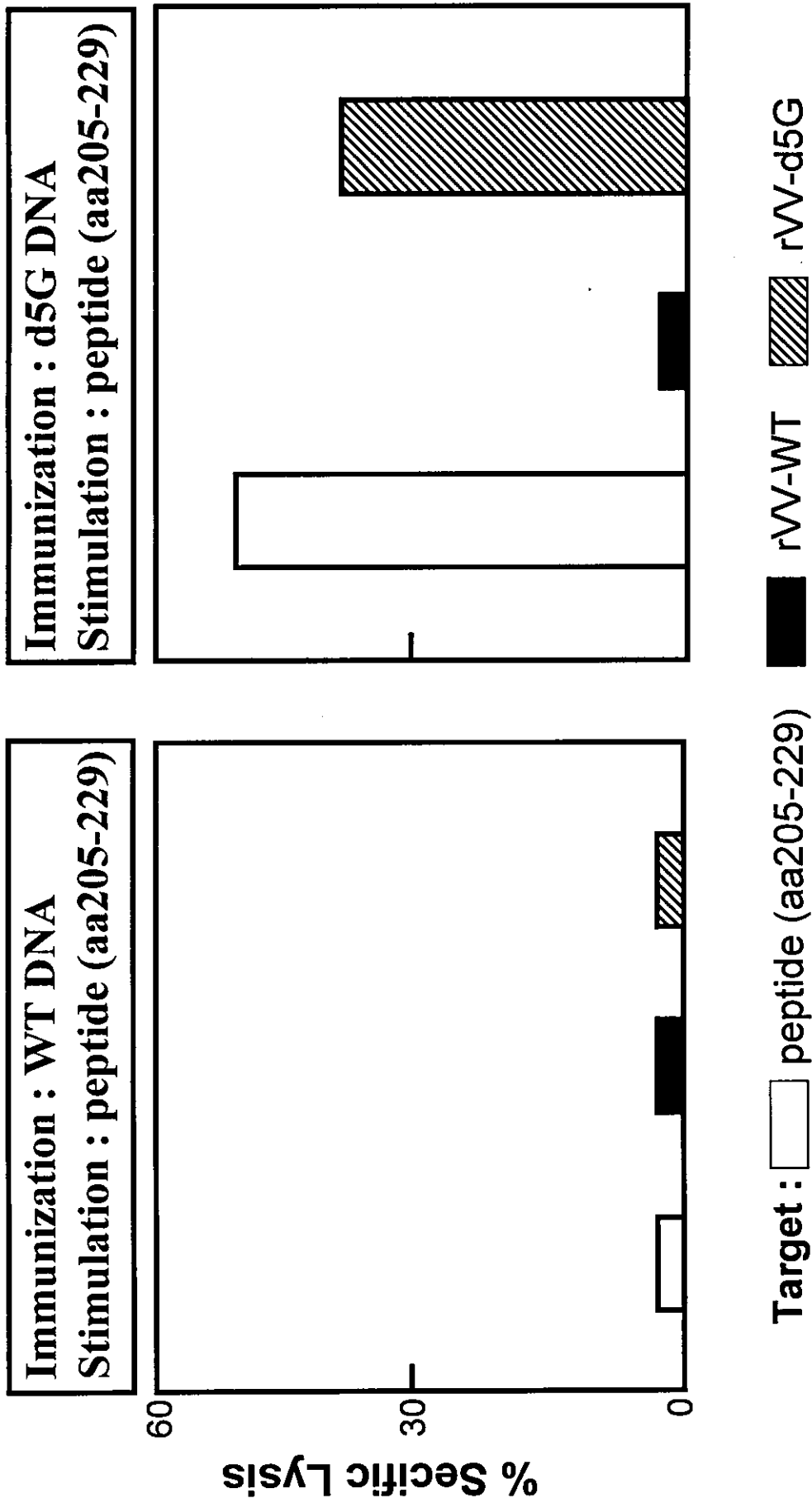


Fig. 5 d5GとWTのエピトープ特異的CTLの誘導とCTLエピトープの発現
d5GおよびWT DNAワクチン免疫マウスの脾細胞をペプチド(aa205-229)で刺激し、標的細胞をペプチド、d5G組み込みワクシニアウイルス、WT組み込みワクシニアウイルスとしてCTL活性を比較した。

SIV 複製及び宿主免疫回避に関わるウイルス側・宿主側因子の作用機構に関する解析

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）
研究協力者 飯島沙幸、李永仲

研究要旨：nef 遺伝子はウイルス感染細胞における MHC-I 発現を抑制することにより、CTL による抗原認識からの回避を可能とする。本研究では、HIV および SIV 由来 nef に共通する MHC-I 発現制御機構を解明するための基盤として、HIV 由来 Nef 蛋白において同機能に寄与するアミノ酸残基の特定を試みた。その結果、HIV/SIV 間で保存性の高い N 末端側 Val16 および Met20 が MHC-I 発現制御を規定しており、その前後に存在する Arg-rich motif は本機能に直接関与していないことが示唆された。本研究成果は、Nef による宿主免疫回避のメカニズムを解明するための重要な知見であると考えられた。

A. 研究目的

SIV サル感染実験系はエイズの動物モデルとして、抗 HIV 薬やワクチン開発のための前臨床試験のみならず、エイズウイルスに特徴的な「アクセサリー遺伝子」の機能的役割の解明においても重要な役割を果たしてきた。アクセサリー遺伝子の一つである nef 遺伝子はエイズ発症に不可欠であり、その作用としてはウイルス複製を促進するのみならず宿主免疫の制御機能を司っていることが知られている。特に後者は、ウイルス感染細胞における MHC class-I 発現を抑制することで CTL による抗原認識を回避する。このような Nef 機能は HIV、SIV とともに認められ、HIV 由来 nef 遺伝子を SIV の nef 遺伝子部位に組み換えたキメラウイルスはサルに病原性を示すことから機能的に補完性があると考えられる。そこで本研究では、HIV および SIV 由来 nef に共通する MHC class-I 発現制御機構を詳細に明らかにするとともに、その機能発現に関わる宿主側因子の役割を解析することを最終目標としたい。

そのために、今年度は HIV 由来 Nef 蛋白の MHC class-I 発現制御に関わるアミノ酸残基を特定し、その分子機構解明の一助とすることを目的とした。

B. 研究方法

env 欠損型 HIV-1 分子クローンである pNL4-3Δenv を基に、Nef N 末端側においてサブタイプ間で保存性の高いアミノ酸残基に各種点変異置換を導入した。これらを VSV-G 発現ベクターと共に HeLa 細胞へ遺伝子導入し、48 時間後 Nef 変異

体を含む VSV-G シュードタイプウイルスおよびウイルス産生細胞を回収した。ウイルスを CEM-GFP 細胞に感染 2-3 日後、ウイルス感染 (GFP 陽性) 細胞表面上の MHC-I 発現量を flow cytometry にて解析した。同時に、得られたウイルス及びウイルス産生細胞について、Western blotting 法により Nef 蛋白を始めとするウイルスタンパク質の解析を行った。

C. 研究結果

これまでの研究より、HIV/SIV Nef N 末端領域はミリスチン酸化を受けるのみならず、塩基性アミノ酸に富んでおり、また α -helix 構造を取ると予想される。このことから、SIV Nef N 末端領域は Matrix と同様にミリスチン酸と α -herix 構造における塩基性アミノ酸による raft への association に寄与すると考えられる。一方 HIV-1 Nef においては、この領域は MHC-I 発現制御機能に大きく関与することが知られており、この領域の欠失または 20 番目のアミノ酸残基である Met の Ala への置換変異 (M20A) により同機能を失活する (Akari et al., J Virol, 2000) が SIV Nef では不明である。興味深いことに、HIV/SIV Nef 16-23 アミノ酸残基は保存性が高く (Fig. 1 参照)、どちらも塩基性アミノ酸に富んでおり、また α -herix 構造を取ると推測される。これらのことから、「Nef16-23 における保存性の高いアミノ酸が MHC-I 発現を調節するドメインである」と予想し

た。そこで、HIV-1 Nef における Arg17, 19, 21, 22 を全て Ala に置換した変異体 ΔR を作成し MHC-I 発現への影響を調べたところ、驚いたことに野生型 Nef とほぼ同等の MHC-I 発現抑制効果を示した (Fig. 2)。同時に行った実験で、ミスチン酸化ドメインを欠失した変異体 Δmyr や M20A は Nef (-) と同様に MHC-I 発現抑制効果を失っていることが確認された。さらに Met20 を Arg に置換した場合 (M20R) においても、M20A と同様に活性が認められなかった。これらの Nef 変異体は全て同程度に発現していることをウエスタンブロッティング法にて確認した (data not shown)。以上のことより、HIV-1 Nef16-23 内の Arg17, 19, 21, 22 は高い保存性を示すにも関わらず Met20 が影響する MHC-I 発現抑制効果には関与していないということが明らかとなった。

そこで、HIV-1 Nef N 末端領域において、Met20 以外に MHC-I 発現抑制効果に寄与するアミノ酸残基の有無について検討した。Nef N 末端 α -helix 領域で良く保存されているアミノ酸残基として Val16, Glu18 について、極性を変えたもの (V16E, V16R, E18R)、及び、同じ極性で側鎖の異なるアミノ酸へ変えたもの (V16A, E18D) を持つ HIV-1 分子クローンを構築した。この変異体 Nef を持つウイルスを上記と同様に作成し、CEM-GFP 細胞における MHC-I への影響について解析を行った。その結果、V16R および V16E で MHC-I 発現抑制効果が顕著に低下する一方、V16A および全ての E18 変異体では影響は見られなかった。これらの変異体について CD4 発現抑制効果を検討したところ、全ての変異体において野生型 Nef と同程度の作用が認められた (Fig. 3)。

D. 考察

Nef 蛋白は、宿主免疫による監視機構からウイルス感染細胞をエスケープさせることにより、エイズウイルス感染の維持や病態発症に重要な役割を果たしていると考えられる。我々は以前の研究において、Nef M20A 変異体を用いることにより、MHC-I 発現抑制効果のみが CTL からの回避に必要十分であることを報告した (Tomiyama et al., J Virol, 2002)。この Met20 を中心に Arg 4 残基などを含む塩基性領域は HIV-1 subtype 間で良く保存されていることや、この領域を欠失することで MHC-I 発現抑制効果が失われることから、この領

域全体が MHC-I 発現制御に重要であると考えられていた。ところが予想に反して、全ての Arg を Ala に置換しても本作用に影響を及ぼさないことが明らかとなった。さらに Val16 を極性の異なる側鎖に置換することでも顕著な機能低下が見られた。以上のことから、Nef16-23 において、MHC-I 発現制御に関与しているのは Val16 および Met20 であることが強く示唆された。また、Arg-rich motif は MHC-I 発現制御とは異なる何らかの機能 (おそらく raft 局在?) に関与するものと考えられた。

興味深いことに HIV-2, SIV においても、HIV-1 Nef Val16/Met20 と同じ位置に類似の疎水性アミノ酸残基 (Leu) が高度に保存されている。このことはこの Di-Leu 残基が HIV-2, SIV においても同様に MHC-I 発現制御に寄与している可能性を示唆するものと思われる。今後は、これらの結果を基に HIV-2, SIV 由来 Nef における同領域の解析を進め、もし我々の仮説が正しいならば、さらにその共通する分子機構を明らかにしていきたい。

E. 結論

HIV/SIV 間で保存性の高い HIV-1 Nef N 末端領域 (Nef16-23) は、これまでの予想に反して MHC-I 発現制御作用および異なる別の機能を調節するアミノ酸残基が離れて混在していることが明らかとなった。本研究結果は、HIV および SIV Nef に共通する MHC-I 発現制御機構を解明するための基盤となるものと期待される。

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) 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

Fig. 1 Potential α -helix motif in the N-terminus of Nef is highly conserved among primate immunodeficiency viruses

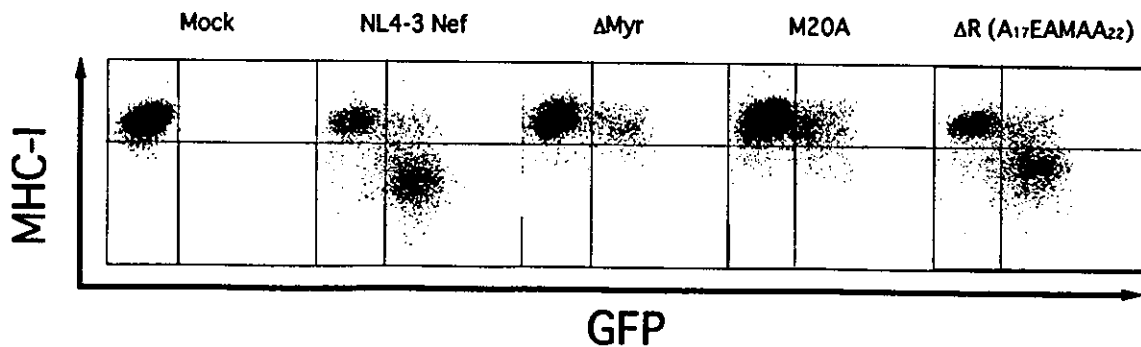
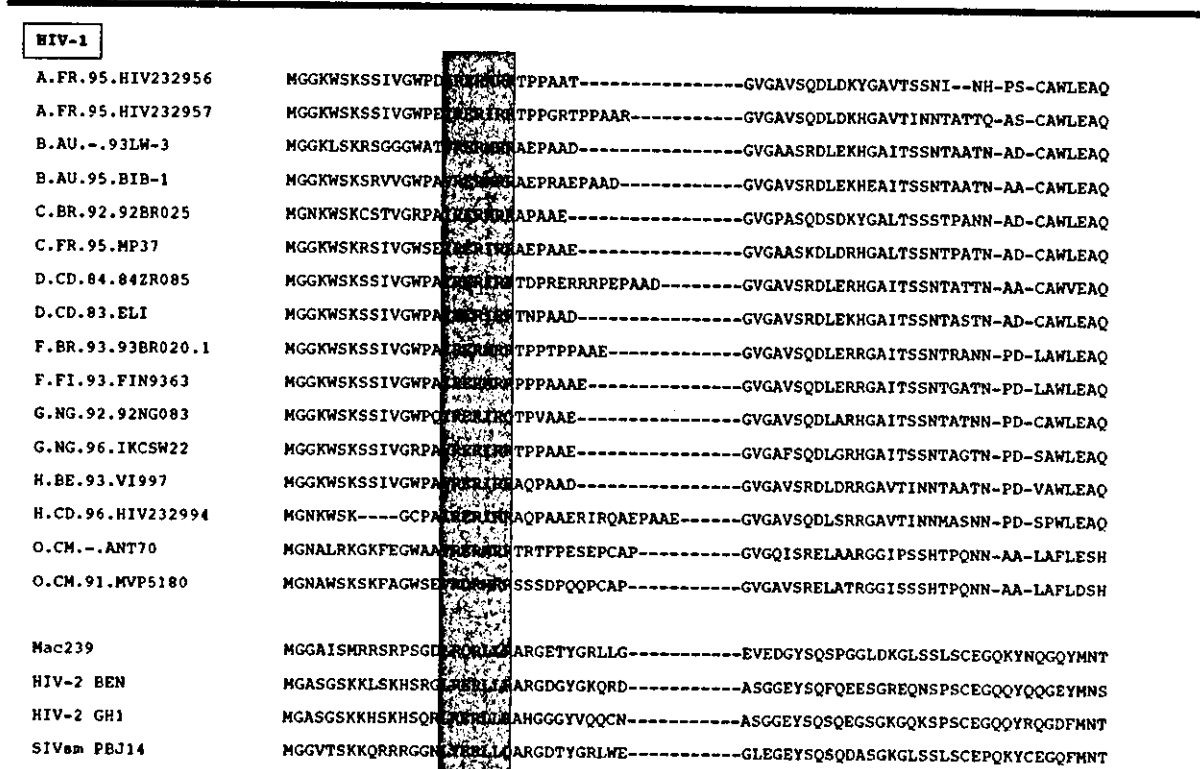


Fig. 2 Effect of Arg-rich region to the ability of Nef to downregulate MHC-I.

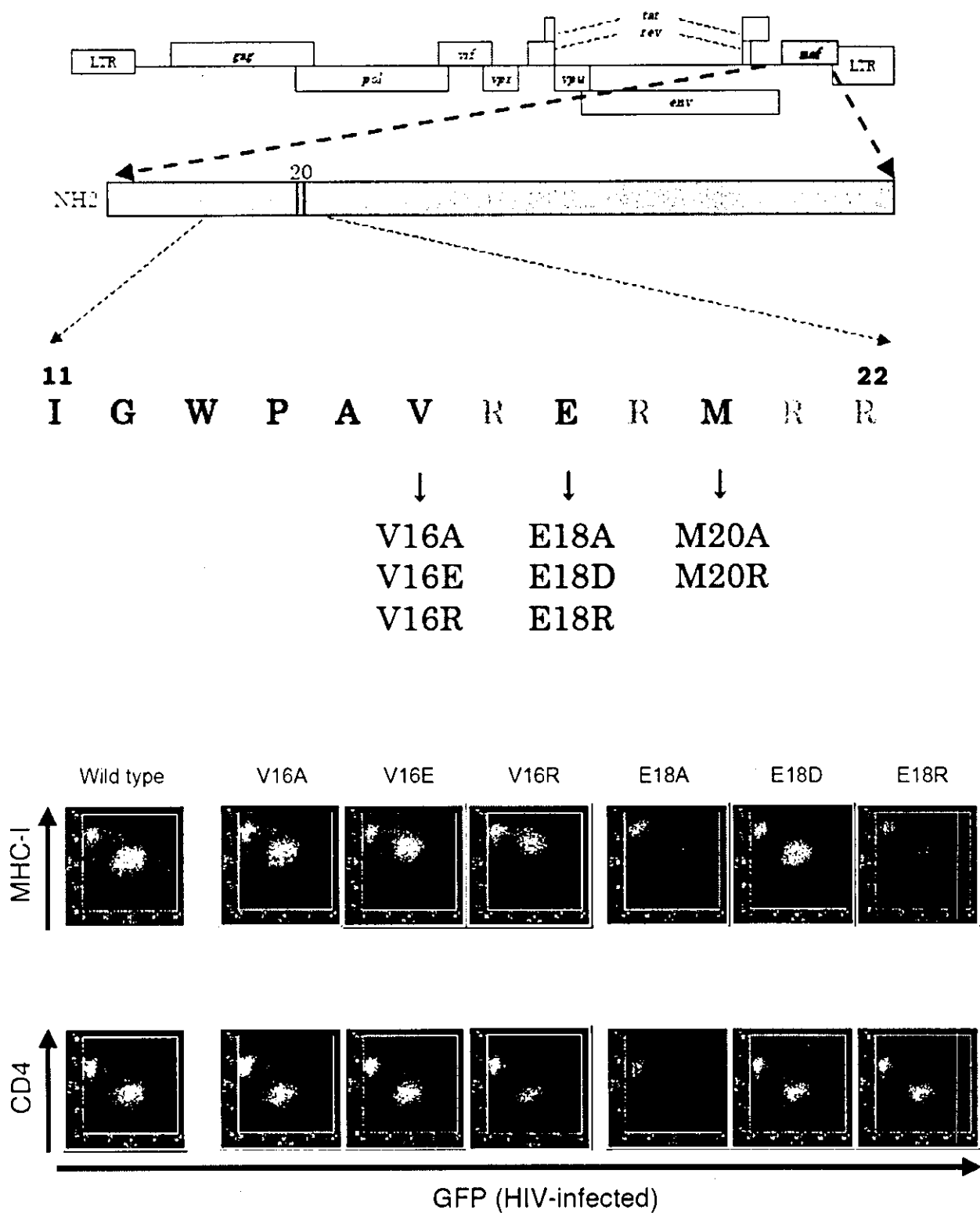


Fig. 3 Contribution of Val16 but not Glu18 to the ability of Nef to downregulate MHC-I.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表