

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

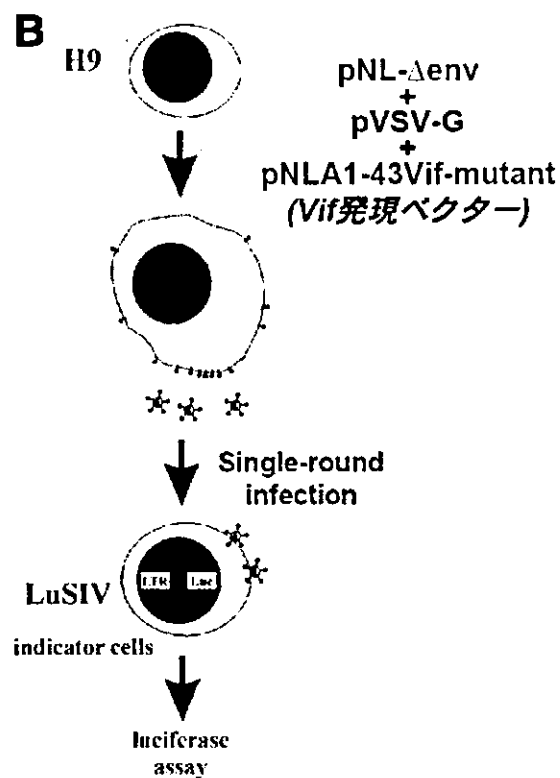
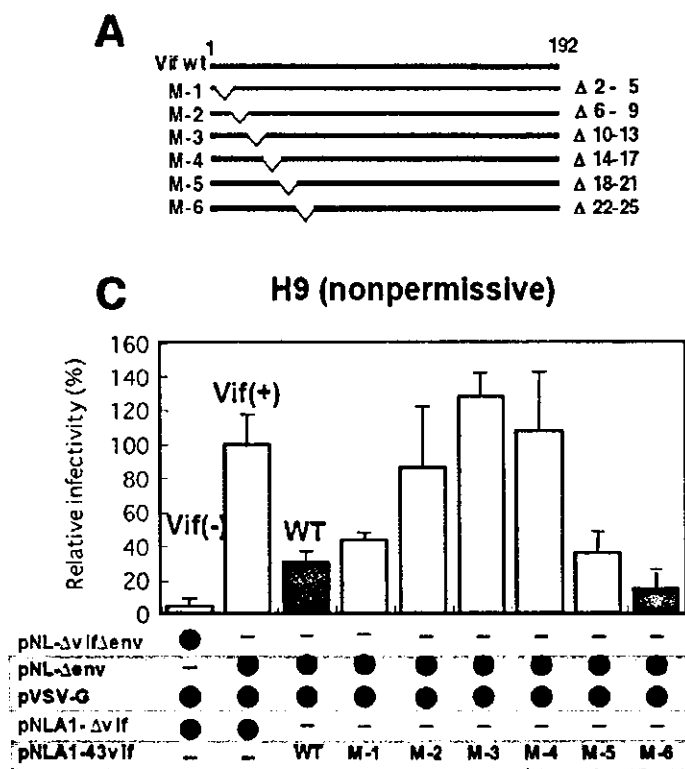


図1. Vif N末端欠失変異体による HIV-1 感染性抑制効果

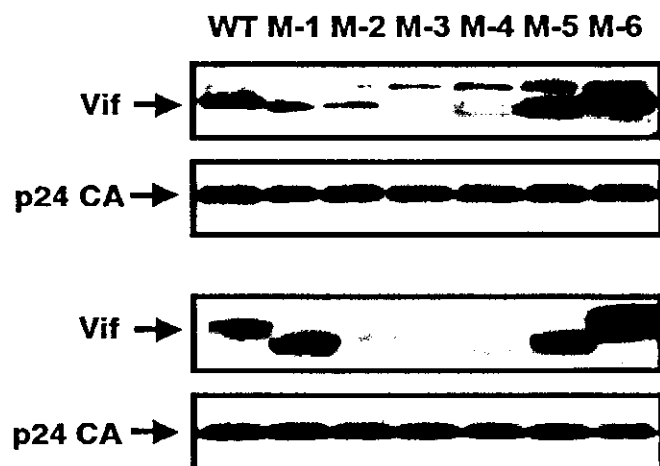
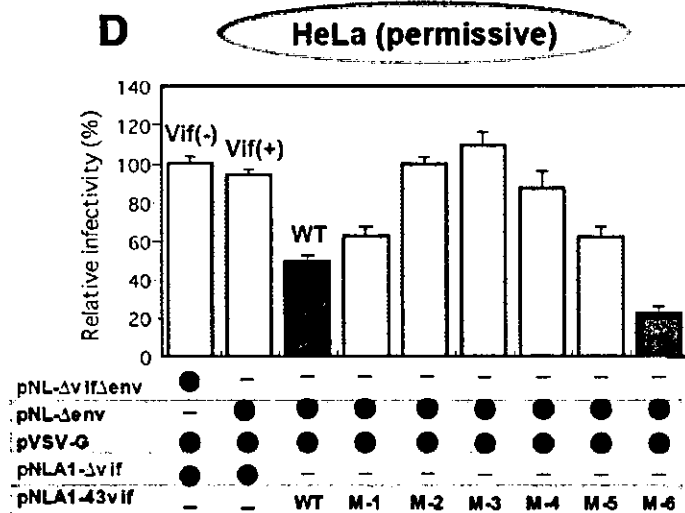


図2. Vif N末端欠失変異体の発現解析

研究要旨

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は感染後細胞内でウイルスゲノム RNA を相補 DNA に変換して組み換え前複合体を形成し、その後核内に移行し宿主染色体に入り込む。この DNA への変換以降のステップのメカニズムを構造と機能の両面から明らかにし、これを制御する技術を開発することを目的とし研究を行った。HIV のウイルス中央多プリン配列 (cPPT) を挿入した HIV ベクターの遺伝子導入効率はその cPPT の長さあるいは、cPPT の近傍領域の配列に依存する場合があることを示した。cPPT は核移行効率に関わるというよりも核移行後のなんらかのステップに重要であることを明らかにした。cPPT の近傍領域には HIV ベクターの RNA 量に関わる働きのあることも明らかにした。ウイルスの組み込みに cis に関わる領域のあることが明らかになった。

A. 研究目的

HIV は(+) 鎖 RNA をゲノムとして有するレトロウイルスであり、ヒト CD 4 陽性細胞に感染する。感染細胞内の細胞質でゲノム RNA は逆転写酵素 (RT) によって線状 2 本鎖 DNA に変換される。この DNA 分子は HIV の組み込み酵素 (IN) を含む様々なタンパク質とともに沈降係数が 300S 以上の大きな核酸-タンパク質複合体 (組み込み前複合体、preintegration complex; PIC) を形成する。メカニズムは不明であるが、この PIC は細胞質から細胞核に移行し、細胞核内で宿主ゲノム DNA に組み込みを起こしてプロウイルスとなる。中央部多プリン配列の上流の約 100 塩基の領域 (dZ 領域) が細胞核内での組み込みに係わっていることを明らかにしてきた。本研究は、この dZ 領域が組み込み後の後期増殖過程にも係わっているかどうかを明らかにする事を目的とする。

B. 研究方法

まず HIV をベースにしたベクター HXN に dZ 断片を挿入し HXN-dZ ベクター DNA を作製した。これをヘルパープラスミド DNA とともにヒト培養細胞 293T にトランスフェクトした。ベクター粒子量を p24 量と RNA 量で定量した。

(倫理面での配慮)

該当しない

C. 研究結果

抗ウイルス遺伝子治療で dZ を利用するために、dZ を有する HIV ベクター (HXN-dZ) の作製を試みた。HXN ベクターに dZ を挿入した場合でも培養上清中にベクター粒子は形成された。しかし、予想外にこれらのベクター粒子にベクター RNA は含まれていなかった。ベクター産生細胞の細胞質と核におけるベクター RNA 量を RT-PCR 法にて調べたところ、HXN-dZ の RNA はベクター産生細胞の核内からは検出できたが、細胞質からは検出されなかった。このことから、HXN ベクターに dZ を挿入することで、ベクター RNA が核外に移動できなくなったことが示唆された。

その一方で、dZ と同時に中央部多プリン領域も挿入した HXN-LCC ベクター RNA は細

胞質から検出された。このことから、HXN ベクターに dZ を挿入したことによる核から細胞質への輸送に対する負の影響は中央部多プリン領域により打ち消されるのではないかと推察された。

更に、HXN-dZ の DNA をコードしているプラスミドと HIV-1_{LAI} の infectious clone をコードしているプラスミド (pLAI) を 293T 細胞に co-transfection して培養上清中に放出される粒子量を測定したところ、HXN の DNA をコードしているプラスミドと pLAI を co-transfection した場合に比べて、培養上清中に放出される粒子量が 30% 程度に減少していた。粒子量が少ないということは、pLAI の全長の RNA が核外に移動できていないことを示唆している。

D. 考察

こ HIV-dZ と HIVLAI が共存した場合にウイルス産生が抑制されたものの機序として、核内にとどまる HXN-dZ の RNA と HIV-1_{LAI} の RNA が dimer などの多量体を形成することで、核外への移動を妨げているのではないかと考えられた。

E. 結論

HIV の増殖後期過程に関わる領域のあることを明らかにした。これを利用して HIV の増殖を制御できる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 発表

(1) 原著

- 1: Zhu D, Taguchi-Nakamura H, Goto M, Odawara T, Nakamura T, Yamada H, Kotaki H,

Sugiura W, Iwamoto A and Kitamura Y.

Influence of single-nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance-1 gene on the cellular export of nelfinavir and its clinical implication for highly-active antiretroviral therapy. Antiviral Therapy. *in press*, 2004.

- 2) Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. J. Virol. 78: 8437-8445, 2004

分担研究者 木村 廣光 国立成育医療センター 研究所・共同研究管理室 室長

研究要旨：ヒト臍帯血，ヒト樹状細胞株、小動物（マウス・ラット）骨髓血液幹細胞並びに、正常皮膚および皮膚由来樹状細胞株を用いて，HIV-1 ウィルスの標的細胞の一つと考えられる，樹状細胞の純粹培養方法の確立とワクチン治療開発を目的として，各種ウィルスベクターの樹状細胞前駆細胞への遺伝子導入の効率の解析を行った。

A. 研究目的

これまでに報告されている、ヒト樹状細胞株：im-NMD、マウス樹状細胞株：XS106と正常ヒト臍帯血中のCD34陽性・血液幹細胞、並びにマウス・ラット骨髓細胞、及び皮膚から、HIV-1の標的細胞である樹状細胞を、純粹培養・分離する培養精製技術を確立し、更に、ワクチン治療開発を目的として、各種ウィルスベクターの樹状細胞前駆細胞への遺伝子導入の効率の解析を行い、小動物実験系への移植システム応用を確立する事により、抗HIV-1薬剤耐性を評価するための実験系を確立する事を目的とする。

B. 研究方法

材料：ヒト樹状細胞株：im-NMD、ヒト臍帯血及び骨髓細胞由来CD34陽性細胞）及びマウス新生児皮膚由来樹状細胞株XS106、正常マウス・ラット骨髓細胞を実験材料として用いた
細胞培養：GIT培地、各種サイトカイン（Flt3,SCF,IL-6,GM-CSF,IL-4,TNF- α ）を用い $1 \times 10^5/\text{ml}$ にて培養
遺伝子導入システム：緑色蛍光タンパク質（EGFP）を発現系とするアデノウィルスベクター、第三世代型HIVウィルスベクター、HVJウィルスベクター

（倫理面への配慮）：

1. ヒト由来細胞はBioWhittaker社：米国FDA認可正常細胞提供プログラムにて調整されたものを実験材料とした。ヒト樹状細胞株はNEMOD Biotherapeutics GmbH & Co. KG（輸

入元：フナコシ株）より購入

2. 遺伝子組み替え実験、並びに小動物の取り扱い並びに飼育・実験方法に関しては、国立成育医療センター 研究所・遺伝子組み替え実験委員会、動物委員会、遺伝子組み替え実験指針・動物取り扱い規則に準じて、実験動物・実験方法に関する申請書関係類書の承諾を得て後、実験を行った。

C. 研究結果

マウス新生児皮膚由来樹状細胞株XS106は、アデノウィルスベクター（AdCMV5GFP）による遺伝子導入効率が、比較的高い事が観察されたが、ヒト慢性骨髓性白血病由来樹状細胞株im-NMD細胞に対する同遺伝子ベクター、またHVJベクターによる、遺伝子導入は極めて困難である事が判明した。本結果は、これまでマウス及びラット骨髓細胞培養法によって得られた樹状細胞に対する遺伝子導入効率が極めて低い事に合致する。但し、FITC標識ランダムプライマーを用いた、HVJベクターからの結果から、樹状細胞内へのプライマー導入は、可能である事から、細胞内に導入された遺伝子が、発現するまでの過程に於いて、外来遺伝子の発現をinterfereないしは、阻害する未知の因子がある事が強く示唆された。

D. 考察

マウス及びヒト樹状細胞を標的細胞とする、遺伝子導入システム、特に、アデノウィルスベクターを用いて報告されてきた。我々は、GM-CSF非依存性樹状細胞培養法により、ラット骨髓細胞から樹状細胞・前駆細胞を増殖・分化させる事により、培養誘導した、樹状細胞、ヒト血液幹細胞から同様に培養誘導した樹状細胞を標的細胞として、各種遺伝子導入ベクターを用いて、遺伝子導入を試みたが、第三世代

HIVウィルスベクター以外に、有効な遺伝子発現を確認する事はできなかった。本研究結果から、樹状細胞が、真にHIV感染のprimary target となりうるか否かに関しては、むしろHIV感染症に対するfirst defenseに関わっている事の可能性が強く示唆された。今後は樹状細胞の種々の分化段階に於ける、樹状細胞が有するサイトカインプロファイルとHIV感染性とウィルス増殖の関係を明らかにする事が極めて重要であると考えられた。

E. 結果

これまで樹状細胞を標的細胞とする各種遺伝子ベクター、特にアデノウィルスを用いた遺伝子導入・発現システムが有効であるとのがなされて来たが、これらの報告は、多くの場合、樹状細胞を含むマクロファージ細胞を標的細胞として実験が施行された可能性が高い。真の樹状細胞は標的細胞とした遺伝子導入システムの解析結果から、樹状細胞が、HIV感染のprimary target としてよりも、むしろHIV感染症に対するfirst defenseに関わっている事の可能性が強く示唆された。

F. 健康危険情報

特記すべき事なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Funeshima N, Fujino M, Kitazawa Y, Hara Y, Hayakawa K, Okuyama T, Kimura H, Li XK. Inhibition of allogeneic T-cell responses by dendritic cells expressing transduced indoleamine 2,3-dioxygenase. J Gene Medicine (In press)

Masui N, Nishikawa T, Takagi Y, Kimura H, Mori M, Yokose S, Asai H, Gonda T, Yanabe M, Sato K.

Establishment of a set of combined immunodeficient DA/Slc-Foxn1(rnu) Lyst(bg) congenic rat strains. Exp Anim. 2004 ;53(5):399-407.

Yan H, Miyagi T, Satoh E, Sugiura W, Yamamoto N, Kimura H.

Phenotype and function of GM-CSF independent dendritic cells generated by

long-term propagation of rat bone marrow cells. Cell Immunol. 2004;229(2):117-29.

Guo L, Li XK, Enosawa S, Funeshima N, Suzuki S, Kimura H, Sugawara Y, Tezuka K, Makuuchi M.

Significant enhancement by anti-ICOS antibody of suboptimal tacrolimus immunosuppression in rat liver transplantation. Liver Transpl. 2004 June;10(6):743-7.

Fujino M, Kitazawa Y, Kawasaki M, Funeshima N, Kimura H, Nakajima T, Saito H, Li XK.

Differences in lymphocyte gene expression between tolerant and syngeneic liver grafted rats. Liver Transpl. 2004 Mar;10(3):379-91.

2. 学会発表

国際学会

Eigo Satoh, Hua Yan, Tohko Miyagi, Xiao-Kang Li, Wataru Sugiura, Naoki Yamamoto, Kenichi Teramoto, Shigeki Arai, Hiromitsu Kimura

DETERMINATION OF THE MOST EFFICIENT VECTOR SYSTEMS FOR GENE TRANSDUCTION INTO DENDRITIC CELLS (DC)

7th Annual meeting of American Society of Gene Therapy, Minneapolis (USA), 2004.6.4

Eigo Satoh, Hua Yan, Tohko Miyagi, Xiao-Kang Li, Wataru Sugiura, Naoki Yamamoto, Kenichi Teramoto, Shigeki Arai, Hiromitsu Kimura

STUDIES ON THE MOST EFFICIENT
VECTOR SYSTEMS FOR GENE
TRANSDUCTION INTO DENDRITIC
CELLS (DC)

XX International Congress of the
Transplantation Society, Vienna (Austria),
2004.9.8-10

Naoko Fuji-Funeshima, Yoshiaki Hara,
Tuhstake Kitazawa, Kensuke Adachi,
Hiromitsu Kimura, Xiao-kang Li

Potential Regulatory Function of Dendritic
Cells Overexpression Indoleamine
2,3-Dioxygenase.

3rd International Congress on
Immunosuppression, San Diego (USA),
2004.12.8-11

Eigo Satoh, Naoko Fuji, Xiao-Kang Li,
Kenichi Teramoto, Shigeki Arii, Hiromitsu
Kimura

EVALUATION OF THE MOST
EFFICIENT VECTOR SYSTEMS FOR
GENE TRANSDUCTION INTO
DENDRITIC CELLS (DC)

3rd International Congress on
Immunosuppression, San Diego (USA),
2004.12.8-11

Eigo Satoh, Yuhichi Hattori, Naoko Fuji,
Xiao-Kang Li, Kenichi Teramoto, Shigeki Arii,
Hiromitsu Kimura

IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECT OF
LONG TERM DRAINAGE OF THORACIC
DUCT ON IMMUNOLOGICAL MEMORY
IN ADULT THYMECTOMIZED RATS

3rd International Congress on
Immunosuppression, San Diego (USA),
2004.12.8-11

H. 知的財産権の出願・登録状況

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（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

SIVを用いた新規抗レトロウイルス薬の開発

分担研究者 駒野 淳 国立感染症研究所 エイズ研究センター 研究員

研究要旨

HIV-1 に最も近縁の HIV-2/SIV を用いて培養細胞レベルの複製系を樹立し、生物学的に安全なレンチウイルス複製阻害剤ハイスループットスクリーニング系（HTS）を確立する。ウイルスに由来する酵素活性を阻害することに重点を置く従来の薬剤とは異なり、宿主因子を標的とする新規な作用機序をもつ先駆的な HIV-1 増殖阻害薬の開発の可能性に繋がる。これは現在のエイズ治療に用いられる HAART 療法で治療できない薬剤耐性ウイルスによる難治症例に適応できるだけでなく、薬剤耐性ウイルスの発生を防止することもできる。HIV-2/SIV の複製評価系は、当班研究でもたらされるリード化合物について、前臨床試験として位置づけられるサルを用いたエイズモデルで検討するかを決定するための評価基盤を提供し、班研究の推進に大きく貢献することが期待できる。

A. 研究目的

世界的に蔓延するエイズに対し、実用に足る有効なワクチンの開発は未だ報告されておらず、化学療法は薬剤耐性ウイルスの発生という難題に直面している。したがってエイズの完全抑止には新たな治療標的の検索が必須である。当研究は宿主因子を標的とする抗エイズウイルス薬を探索するものである。これは現存する化学療法（HAART 療法）の重大な問題点である薬剤耐性ウイルスの発生を回避できるだけでなく、薬剤耐性ウイルスによる難治症例の治療をも可能にする。

HIV-1 複製系を用いた抗エイズ薬スクリーニングは、安全性という点で HTP 系構築の可塑性を妨げる。これに対し、HIV-1 に最も近縁の HIV-2/SIV の複製系は安全な HTS 系を構築してレンチウイルス複製阻害剤を探索することを可能にする。HIV-1/SIV の感染系は、当班研究で得られた抗 HIV 剤

候補化合物について実際に前臨床段階としてのサルのエイズモデルで検討するかを決定する際の重要な判定材料を提供する。これは班研究において重要な一側面であり、当研究が果たす役割は非常に大きいと考えられる。

B. 研究方法

HIV-1 に最も近縁の HIV-2/SIV の中から、最も代表的なクローンである SIVmac239 (Fig. 1) を選び、その複製系を利用して安全なレンチウイルス複製阻害剤探索の HTS 系樹立を試みる。Gundlach らが 1997 年に J. Virol に報告した nef の ORF に IL-2 が挿入された組み替え SIV 系をもとに、ルシフェラーゼをもつ組み替え SIV を作出する (Fig. 2)。組み替え SIV の複製能力を確かめると同時にルシフェラーゼが発現するか、ルシフェラーゼ活性がウイルス複製の程度を反映するか、シグナル／ノイズ比は高いか、既存の抗エ

イズ薬が有効かなどを検討する。

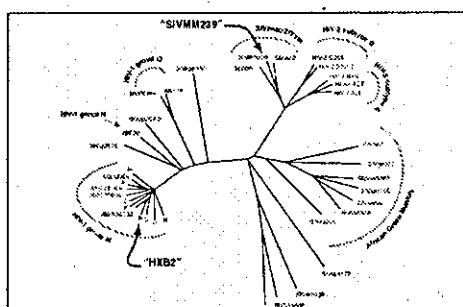


Fig. 1 The similarity of HIV-1(HXB2) and SIVmac239/HIV-2 visualized in the phylogenetic tree.

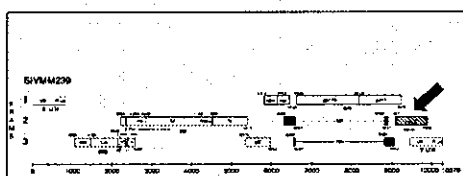


Fig. 2 The genetic organization of the SIV Δ nefLuc (SIV-Luc) tested in this study. The nef ORF (arrowhead) was replaced with the luciferase. The expression of luciferase represents the viral infection and propagation in the tissue culture system (Komano J, et al., Mol Biol Cell 2004).

一方、感染標的となる細胞を樹立する。SIVに感受性があるだけでなく、ルシフェラーゼ発現効率の高い細胞でなければならない。接着細胞だけでなく浮遊細胞、またヒトだけでなくサル由来の細胞株などを多数試験して、従来よく使われているHeLa細胞に由来するレポーター細胞と比較して最もHTS系に適合したものを選定する。

(倫理面への配慮)

特記すべきことなし。

C. 研究結果

ルシフェラーゼをもつ組み替えSIV Δ nefLucを作出し、その複製能を検証した (Fig. 3: Komano et al., Mol Biol Cell 2004)。

Luciferase activity (RLU/1")	
Expt 1 (6 days p.i.)	
uninfected	0.006
SIV-Luc infected	0.367 (61-fold)
Expt 2 (7 days p.i.)	
uninfected	0.005
SIV-Luc infected	0.373 (74-fold)
Expt 3 (9 days p.i.)	
uninfected	0.007
SIV-Luc infected	1.207 (>100-fold)

Fig. 3 Detection of SIV Δ nefLuc infection in BJAB CCiC cell line. The luciferase activity was measured by using the Promega kit with the Lmax (Molecular Dynamics). Shown are the three independent trials.

このウイルス複製は感染に際してルシフェラーゼを発現することを確認めた。シグナル/ノイズ比は再現性よく50以上を与え、特異性の高い系であることが示された。既存の抗エイズ薬AZT、NFV、SQVに感受性を持ち、薬剤非存在下と比較して10-30%程度の感染抑制効果を再現性よく検出した (Fig. 4)。ウイルス複製をルシフェラーゼ発現量として評価できることが判明した。

SIV-Luc infected, harvested 5 days p.i.	
uninfected	0.002
infected	0.123 (61-fold)
infected with AZT (2 μ M)	0.018 (15%)

Fig. 4 Inhibition of SIV Δ nefLuc infection by AZT in BJAB CCiC cell line. The viral infection was quantified by detecting the luciferase activities in the infected cells as indicated by the relative light unit per second (RLU/1 sec). The percentage represents the magnitude of reduction of viral infection. Similar results were obtained for both NFV and SQV.

一方、ヒトCD4とCCR5を共に発現する感染標的細胞株として、ヒト腎臓由来の上皮細胞293あるいはヒトバーキットリンパ腫由来のBJAB細胞をもとに293/CCiC細胞とBJAB/CCiCをそれぞれ樹立し、組み替えSIVによる被感染性を有すること、ルシフェラーゼ発現効率がHeLa細胞に由来する指示細胞株や、ヒトとサル由来の複数のT細胞株

(H9, SupT1, PM1, M8166など) より優れていることを確認した。ルシフェラーゼ活性は感染後2日から検出され、感染後9日まで十分な検出感度が維持できた。

D. 考察

組み替え SIV Δ nefLuc 複製系を作出し、感染標的細胞に既存のレポーター細胞より高いウイルス感染検出感度を有する系であることが示された。CCR5 の恒常的発現が細胞増殖を抑制する傾向が複数の細胞株で明らかとなった。実際 BJAB/CCiC における CCR5 発現量は培養が長期間に及ぶと漸減する。これは 293CCiC には見られなかった。再現性のある HTS 系では、一定したウイルスレセプター発現量の維持が求められる。Screening に際して BJAB/CCiC を利用する場合、この細胞株を改変して CCR5 の発現量が安定なクローン樹立が必要であろう。

一方、班研究にて同定されたリード化合物に対して、当研究で作出されたルシフェラーゼをもつ組み替え SIV 複製系が試験的に導入されている。これは将来のサルモデルによる抗エイズ薬の前臨床試験実施に重要な示唆を与えていると考えている。また、阻害剤の作用機序を解析するなど、ウイルス学的解析にも有用な実験系になるであろうと思われる。

E. 結論

複製能力を有するレポーターウイルスとして SIV Δ nefLuc の作出に成功した。このウイルス感染をモニターするために適した

培養細胞として、293/CCiC 細胞と BJAB/CCiC をそれぞれ樹立した。これらは抗レンチウイルス剤の HTS 系樹立に有用であると同時に、抗 HIV 作用を持つリード化合物の持つ SIV 複製阻害効果を判定するために優れた系であることが示された。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N. Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of Both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses. *Mol Biol Cell*. 2004 Dec; 15(12): 5197-207. Epub 2004 Sep 22.

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)

Miyauchi K, Komano J, Myint L, Futahashi Y, Urano E, Matsuda Z, Chiba T, Miura H, Sugiura W, Yamamoto N. A pyrimidinylpropanamide antibiotic sparsomycin enhances the replication of human immunodeficiency virus type 1. *J*

2. 学会発表

May 25-30 (Poster) Kosuke Miyauchi, Jun Komano, Yoshiyuki Yokomaku, Zene Matsuda, The membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 is involved in the late steps of the membrane fusion, Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

May 25-30 (Poster) Zene Matsuda, Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Naoki Yamamoto, Inhibiting Arp2/3 complex limits infection of primate lentiviruses, Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

June 04-06 (Oral) Jun Komano, Do HIV-1's receptor/coreceptor molecules cluster upon viral attachment?, レトロウイルス研究会夏期セミナー (SRC2004) 千葉県長生郡長柄町

Aug 30-Sep 02 (Poster) Jun Komano, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda, and Naoki Yamamoto, Inhibiting the Arp2/3 Complex Limits Infection of both Intracellular Mature Vaccinia Virus and Primate Lentiviruses, The 4th Awaji International Forum on Infection and Immunity, The Hyogo Prefectural Awaji Yumebutai International Conference

Nov 21-23 (poster) 駒野 淳、浦野 恵美子、二橋 悠子、宮内 浩典、松田 善衛、山本 直樹、ウサギ由来の RK13 細胞においてヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)感染は逆転写後に抑制される, 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

Nov 21-23 (Poster) 駒野 淳、宮内 浩典、松田 善衛、山本 直樹、感染初期過程におけるウイルス種特異的なアクション利用の相違, 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

Nov 21-23 (Oral) 駒野 淳、宮内 浩典、二橋 悠子、浦野 恵美子、松田 善衛、千葉 智子、三浦 秀佳、Lay Myint、杉浦 亙、山本 直樹、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)複製を特異的に増強する小分子化合物 sparsomycin, 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

Nov 21-23 (Poster) 宮内 浩典、駒野 淳、松田 善衛, Alanine-insertion mutagenesis in membrane-spanning domain of HIV-1gp41, 第52回日本ウイルス学会学術集会、横浜

Dec 8-11 (Poster) Jun Komano, Emiko Urano, Yuko Futahashi, Kosuke Miyauchi, Zene Matsuda, and Naoki Yamamoto, Restriction of HIV-1 infection at the

post-nuclear translocation process in rabbit cell line RK13, the 27th Annual Meeting of the MBSJ, Kobe, Japan

Dec 8-11 (Poster) 宮内 浩典、駒野 淳、松田 善衛, Ala 残基挿入変異による HIV-1gp41 膜貫通領域の構造機能連関の解析 Analysis of structure-function relationship of membrane spanning domain of HIV-1 gp41 by scanning alanine-insertion mutagenesis, the 27th Annual Meeting of the MBSJ, Kobe, Japan

Dec 7-10, (Oral) Jun Komano, Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses, the 40th US-Japan Cooperative Medical Science Program, AIDS Panel, Kyoto, Japan

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

Nov 2, US patent #6,811,983

A Method of Identifying Inhibitors of EBNA-1

William M. Sugden, A. Jun Komano, Gregory D. Kennedy

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（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

接着・侵入阻害剤及びインテグラーゼ阻害剤の開発
分担研究者 田中晴雄 北里大学薬学部微生物薬品製造学教室 教授

研究要旨

- 1) 抗 HIV タンパク質アクチノヒビン (AH) が認識する gp120 の糖鎖種を明らかにする目的で、種々のグリコシダーゼで処理した gp120 と AH との親和性について分子間相互作用解析装置を用いて検討した結果、AH は高マンノース型糖鎖の末端に存在する $\alpha(1-2)$ 結合の mannose 残基を認識して gp120 に結合することが明らかとなった。
- 2) AH の gp120 結合特性を明らかにする目的で、他のレクチンと各種糖タンパク質に対する親和性を比較した。その結果、AH が持つ 3 つの糖鎖結合部位が糖タンパク質上の複数の高マンノース型糖鎖に結合することにより強い親和性を示し (クラスター効果)、gp120 の様に糖鎖に富んだ糖タンパク質に選択的に結合することが示唆された。
- 3) これまでの研究により明らかにされた AH の構造と抗 HIV 活性の相関性に関する知見をもとに、AH の活性の向上を目的として各種 AH 変異体を作成し、13 アミノ酸のペプチドを介して AH を二分子連結した二量体と糖鎖結合領域のアミノ酸配列を改良した誘導体で合胞体形成阻害活性が 2 倍に増強された。

A. 研究目的

エイズの発症予防と治療のために、現在逆転写酵素阻害剤とプロテアーゼ阻害剤を用いる多剤併用療法が実施され成果を挙げているが、多剤耐性株の出現、治療中断によるウイルスのリバウンド、様々な副作用などの問題が残されており、しかも完全治癒は不可能である。

当研究室で開発した env 発現細胞と受容体発現細胞を用いる合胞体形成系を用いることによって発見された抗 HIV タンパク質アクチノヒビン (AH) は gp120 の高マンノース型糖鎖の $\alpha(1-2)$ mannobiose および $\alpha(1-2)$ mannotriose に結合することにより HIV の細胞への接着・侵入を阻害すると推察されている。また、AH は 114 アミノ酸から成るが、お互いに相同性の高い 38 アミノ酸残基の 3 つのセグメントを含み、活性発現には 3 つのセグメントが必要であることが明らかとなっている。本研究では、さらに AH の糖鎖認識機構を明らかにすると共に、高活性の AH 変異体を得ることを目的として研究を進めた。

B. 研究方法

<AH の gp120 糖鎖への結合>

AH と gp120 の結合について分子間相互作用解析装置 IAsys を用いて測定した。HIV-1 NL4-3 由来 env 発現 HcLa/T-env 細胞の培養上清より精

製した gp120 を各種エンドグリコシダーゼで処理した後、IAsys 用アミノシランキュベットに固相化した AH との結合を酵素処理していない gp120 と比較した。

<AH の糖タンパク質に対する結合特性>

ELISA 法：糖タンパク質を固相化した ELISA プレートに、AH あるいは比較対象レクチンを加えて反応後、糖タンパク質に結合した各レクチンを、それぞれに対する抗体を用いて検出した。

分子間相互作用解析：IAsys 用カルボキシレートキュベットに gp120 または RNase B (糖鎖 1 つ) を固相化した。そこへ AH あるいは比較対象レクチンを加え、結合・解離曲線から結合速度定数および解離速度定数を解析ソフト FASTfit で計算し、その結果から解離平衡定数 (親和性) を求めた。

<DC-SIGN-gp120 の結合に対する AH の影響>

DC-SIGN 発現細胞の樹立：CHO 細胞に DC-SIGN 発現プラスミド pcDNA-DC-SIGN (NIH AIDS Res. Ref. Program より分与) をリン酸カルシウム法により導入し、恒常的に DC-SIGN を発現する細胞株 CHO-DC-SIGN#6 を樹立した。コントロール細胞には pcDNA ベクターのみを導入した G418 耐性 CHO 細胞を用いた。

免疫沈降法：CHO-DC-SIGN 細胞および

CHO-G418細胞各 5×10^6 cells/sample を用意し、遠心により細胞を回収した。細胞に精製した gp120 (2.5 nmol 相当) 及び試験サンプルを加えて培地 (10% FBS Ham F12) で 300 μ L とし、5% CO₂ 存在下 37.C で 1 時間反応させた。遠心により細胞を回収し、PBS(-) で 2 回洗浄後、細胞溶解液 (1% Brij 97, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, protease inhibitor) を加えて細胞を溶かした。免疫沈降には gp120 モノクローナル抗体 #902 (NIH AIDS Res. Ref. Program より分与) を使用し、これを吸着させた protein G Sepharose beads と細胞溶解液を一晩反応させ、吸着した gp120 タンパク質をウェスタンブロットで検出した。

<AH の HIV 接着侵入阻害機構の解析>

細胞表面 CD4 への gp120 の結合に対する AH の影響 (免疫沈降): ヒト T リンパ球由来 CEM 細胞 (CD4⁺) 5×10^6 cells/sample を用意し、遠心により細胞を回収した。細胞に精製した gp120 タンパク質 (2.5 nmol 相当) 及び試験サンプルを加えて培地 (10% FBS 含有 RPMI 培地) で 300 μ L とし、5% CO₂ 存在下 37.C で 1 時間反応させた。遠心により細胞を回収し、PBS(-) で 2 回洗浄後、細胞溶解液 (1% Brij 97, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, protease inhibitor) を加えて細胞を溶かした。免疫沈降には gp120 モノクローナル抗体 #902 (NIH AIDS Res. Ref. Program より分与) を使用し、これを吸着させた protein G Sepharose beads と細胞溶解液を一晩反応させ、吸着した gp120 タンパク質をウェスタンブロットで検出した。

ウイルス液の作製: 10% FBS 含有 MEM 培地で継代した 293T 細胞を 4×10^6 cells/10cm dish となるよう播き、37.C 5% CO₂ 存在下で一晩培養した。OPTI-MEM 3mL で細胞を 1 回洗浄後、OPTI-MEM 2 mL を加えた。3 mL OPTI-MEM に Lipofectamine2000 60 μ L、pNL4-3.Luc.R-E 及び pDOLHIVenv 各 12 μ g ずつ加えて室温で 20 分間放置したものを細胞に添加し、37.C 5% CO₂ 存在下で 4-5 時間培養することでトランスフェクション反応を行った。その後、OPTI-MEM 溶液を除き、10% FBS 含有 MEM 培地 10 mL を加え、トランスフェクションから 48 時間後の培養上清を回収し、ボアサイズ 0.45 μ m のフィルターで濾過した。培養上清中のキャプシドタンパク質 (p24) 量を HIV-1 p24 antigen ELISA kit を用いて測定した。

感染実験: 10% FBS 含有 MEM 培地で継代し

た HOS/CD4/CXCR4 細胞を 1×10^5 cells/well とするよう 12-well plate に播き、37.C 5% CO₂ 存在下で一晩培養した。FBS 不含 MEM 培地で細胞を 1 回洗浄後、FBS 不含 MEM 培地で希釈した 100 ng p24 を含むウイルス液 300 μ L を加えて 37.C または 4.C で 1 時間インキュベートした。ウイルス液を除き FBS 不含 MEM 培地で 2 回洗浄した後、10% FBS 含有 MEM 培地 1 mL を加えて 3 日間培養した。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、luciferase cell lysis reagent 300 μ L を加えて室温で 5 分以上放置することで細胞を溶解させた。細胞溶解液を 12,000 rpm で 10 分間遠心分離後、上清を回収した。上清 20 μ L をルミノメーター用 96-well plate に移し、luciferase assay reagent 100 μ L を加えて生じる発光をルミノメーターで測定した。

<His-AH dimer 遺伝子構築方法>

AH 遺伝子を保持するプラスミド、pBSK+:2A3K を鋳型として、AA-1 Bam (GGG ATC CGC CTC GGT GAC C) 及び AH-Link (GTT AAG CTT CTT GGC GCC GGT GTA CC) の 2 種のプライマーを用いて PCR により AH 遺伝子を増幅した。これにより、AH 遺伝子の 3' 末端に Linker 遺伝子の 5' 末端側 15 塩基対分を付加させた N-AH 遺伝子を作成した。Linker の遺伝子は Link-sen (GCC AAG AAG CTT AAC GAC GAC GCT CAG G) 及び Link-asn (ATC ACT CTT CGG CGC CTG AGC GTC G) の 2 種のプライマーを用い、それぞれの 3' 末端側 11 塩基分でオーバーラップさせ、プライマーダイマーを形成させることで PCR により作成した。AH 遺伝子を Link-dAH (GCG CCG AAG AGT GAT GCC TCG GTG ACC) 及び TGA Eco (GGA ATT CAG CCG GTG TAC CAC TTC TG) を用いて PCR で増幅し、AH 遺伝子の 5' 末端に Linker 遺伝子の 3' 末端側 15 塩基対分を付加させた C-AH 遺伝子を作成した。Linker 遺伝子と C-AH 遺伝子を鋳型とし、Link-sen 及び TGA Eco を用いて SOE 法による PCR で、AH 遺伝子の 5' 末端に Linker の全長遺伝子を付加させた L-AH 遺伝子を作成した。N-AH 遺伝子と L-AH 遺伝子をそれぞれ制限酵素、BamH I と Hind III 及び Hind III と EcoR I で消化した。この 2 つの DNA 断片を BamH I と EcoR I で消化した pUC19 に同時にクローニングし、AH dimer 遺伝子を含むプラスミド、pUC19:dAH を作成した。このプラスミドを鋳型として、AA-1 LIC (GGT ATT GAG GGT CGC GCC TCG GTG ACC ATC) 及び TGA 114

LIC (AGA GGA GAG TTA GAG CCT CAG CCG GTG TAC) を用いて PCR により AH dimer 遺伝子を増幅した。この DNA 断片を大腸菌発現ベクター pET30 Xa/LIC に連結し、His-AH dimer 発現プラスミド、pET30:dAH を構築した。

<1 アミノ酸置換変異体遺伝子構築方法>

1 アミノ酸置換変異体遺伝子は SOE 法を用いた PCR により構築した。AH 遺伝子を保持するプラスミド、pBSK+:2A3K を鋳型とし、変異を導入する塩基を境に AH 遺伝子を前半部と後半部に分け、前半部分の 3' 末端及び後半部分の 5' 末端が 20 bp 程度でオーバーラップするように PCR で増幅した。増幅産物をアガロースゲルで精製し、DNA 断片を回収して DNA 溶液 20 μ L を得た。得られた前半部及び後半部遺伝子溶液のそれぞれ 1 μ L ずつを鋳型とし、PCR により変異が導入された全長遺伝子を増幅した。再び、増幅産物を精製し、これを pET 30 Xa/LIC に連結し、1 アミノ酸置換変異体発現プラスミドを構築した。

C. 研究結果

(1) AH の糖鎖認識機構

1) AH の HIV gp120 糖鎖への結合：これまでの研究から HIV の細胞への接着侵入過程を阻害する AH は、HIV の外套タンパク質 gp120 の高マンノース型糖鎖 (HM) に結合すると推定されている。また、AH と gp120 の結合は yeast mannan で強く阻害 ($IC_{50}=0.003 \mu\text{g/mL}$) されるが、yeast mannan の構造中にも存在する α (1-2) 結合を持つ α (1-2) mannobiose および α (1-2) mannotriose によって弱いながらも阻害が認められることから、HM の α 1-2 結合 mannose 部分を認識するものと考えられた (α (1-3) および α (1-6) mannobiose では全く影響なし)。そこで、精製した gp120 を用いて、各種グリコシダーゼ処理したときの AH との親和性について分子間相互作用解析装置 IAsys を用いて測定した。まず、gp120 をエンドグリコシダーゼ H または 1,2- α -マンノシダーゼで処理した場合には AH と結合しなくなった (図 1) ことから、AH は HM の Man α (1 $\rightarrow$ 2)Man 構造を認識して gp120 に結合することが明らかとなった。次に、gp120 をシアリダーゼ 及び β -ガラクトシダーゼで処理したところ IAsys でのレスポンスの減少は認められなかったことから、AH は HM 以外の糖鎖には結合しないと考えられた。

2) AH の各種糖タンパク質に対する結合特性：

HM 数の異なる糖タンパク質に対する AH の結合性をマンノースを認識する他のレクチンと ELISA 法により比較した。比較対象のレクチンとして、抗 HIV 活性を有するシアノバクテリア *Nostoc ellipsosporum* 由来の cyanovirin-N (CV-N)、およびヒガンバナ科の植物 *Galanthus nivalis* のレクチン *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) を用いた。CV-N は Man α (1 $\rightarrow$ 2) Man 構造に、GNA は Man α (1 $\rightarrow$ 3) Man 構造や Man α (1 $\rightarrow$ 6) Man 構造に結合すると報告されている。用いた糖タンパク質は、gp120 (N-結合型糖鎖 24 本中 11 本が HM もしくはハイブリッド型)、thyroglobulin (Thg, N-結合型糖鎖 14 本中 4 本が HM)、ribonuclease B (RNase B, HM が 1 本のみ)、bovine serum albumin (BSA, 糖鎖無し) である。ELISA プレートに上記糖タンパク質を固相化して、各種レクチンを作用させた後、それぞれの抗体を用いて結合量を検出した結果、CV-N は gp120、Thg、RNase B に一様に強い結合を示したのに対し、AH と GNA では gp120 に選択的な結合がみられた (図 2)。特に AH は HM の数に応じた高い選択性を示した。次に、分子間相互作用解析装置 IAsys を用いて gp120 および RNase B に対する AH、CV-N、GNA の親和性を測定した (表 1)。解析の結果、gp120 については AH、CV-N、GNA とともに解離平衡定数が 10^{-8} オーダーの強い親和性を示した。しかし、HM が 1 つしかない RNase B については、CV-N は gp120 の場合と同程度の親和性を示したのに対して、AH では結合が認められなかった。GNA は CV-N に比べると若干弱い親和性を示した。3) DC-SIGN と gp120 の結合に対する AH の影響：HIV をはじめとする様々な感染症に関わる生体内分子として注目されている DC-SIGN の gp120 糖鎖を介した HIV の捕捉作用に対する AH の効果を調べた。AH がこのような作用を阻害できれば、さらなる感染予防効果が期待できると考えられる。DC-SIGN と gp120 の結合は yeast mannan の存在により阻害されることが報告されているが、本アッセイ系においても $0.06 \mu\text{g/mL}$ の yeast mannan の添加により gp120 の結合がほぼ阻害された (図 3-B)。AH の場合、 $5 \mu\text{M}$ 以上で 50% 程度の阻害効果が認められた。一方、糖鎖結合活性を失わせた変異体 AH (mA-His-AH(Q33A/Q71A/Q109A)) の場合では $10 \mu\text{M}$ の濃度でも阻害は認められなかった (図 3-A)。CV-N については gp120 と DC-SIGN の結合を阻害しないという報告がされているが、本実験系

では0.3 μ M 添加することで gp120 のバンドが完全に消失した。しかし、抗 HIV 活性を示す濃度 (HIV-1_{III}B に対して 0.4 nM) では影響がないことから AH 同様 gp120 と DC-SIGN の結合に対しての阻害効果は低いと考えられた。

(2) AH の接着・侵入阻害機構

AH が gp120 糖鎖に結合することによって HIV の細胞への接着侵入のどの段階が阻害されるのかを調べる目的で、まず、CD4 と gp120 の結合に対する AH の影響について、CD4 陽性 CEM 細胞と精製した gp120 を用いて免疫沈降法で検討した。CD4 陽性 CEM 細胞に gp120 およびサンプルを加えて 1 時間反応して、細胞に結合した gp120 を免疫沈降法にて回収後、ウェスタンブロットで検出した。コントロールとして CV-N を用いた。CV-N は gp120 糖鎖に結合するだけでなく gp120 の CD4 への結合も阻害することが報告されているが、本実験系においても CV-N が細胞への gp120 の結合を阻害することが再現された (図 4-C)。AH については、gp120 バンドの減少は認められたが、10 μ M 添加した場合でも消失しなかったことから、gp120 の CD4 との結合に対して直接的には影響を与えないと思われる (図 4-AB)。本実験系において gp120-CD4 およびケモカインレセプターのコンプレックスの沈降を検出することを試みたがうまくいかなかったため、今後、別の方法で検討する予定である。

次に、複製能力を欠いたシュードタイプ HIV を用いて、ウイルス吸着時に AH または CV-N を加えた場合と吸着後に加えた場合の感染を比較した。細胞にウイルスと AH または CV-N を共存させて 37.C で 1 時間反応させた場合は、洗浄を行っても両者とも抗ウイルス活性を示したが、ウイルスを 37.C で 1 時間処理後に薬剤を加えた場合には、両者とも HIV の感染を抑えることはできなかった。これは、1 時間インキュベーションの間に細胞膜とウイルスの融合反応が終了してしまうことによると考えられる。したがって、両者ともウイルスの細胞への接着・侵入段階を阻害していることが確認できた。一方、細胞を 4.C でウイルス処理した場合、細胞膜とウイルスの一連の融合反応の最初の反応と考えられている gp120 と CD4 の結合は起こるものの、その後にかかる gp120 の構造変化、ケモカイン受容体との反応は 4.C の状態では進まないとされている。そこで、4.C において細

胞にウイルスを接触させるときの薬剤の有無によって感染に差があるかどうか調べた。ウイルスと薬剤を 4.C で 1 時間反応後、洗浄して 37.C で培養する場合と、ウイルスを 4.C で 1 時間接触後、洗浄して薬剤を添加してから 37.C で培養を行った場合について比較した。その結果、CV-N ではどちらの場合も同程度の抗ウイルス活性を示したのに対し、AH の場合にはウイルスと薬剤を 4.C で反応させた後、洗浄することにより抗ウイルス活性が減弱した (図 5)。CV-N については gp120-CD4 の結合および結合後の過程の両方を阻害するため両条件において差は見られないが、AH については、gp120-CD4 の結合後の過程に作用しているものと考えられる。

(3) AH の高活性変異体

これまでの研究により明らかにされた AH の構造と抗 HIV 活性の相関性に関する知見をもとに、AH の活性の向上を目的として各種 AH 変異体を作成した。AH は相同性の高い 3 つのセグメントを持ち、それらはそれぞれ gp120 に存在する別々の糖鎖と結合することにより、いわゆるレクチンのクラスター効果が働いて強い抗 HIV 活性を示すことが明らかとなった。したがって、AH の抗 HIV 活性を上昇させるためには、糖鎖との結合部分を増やすことにより、さらに強いクラスター効果を働かせることが効果的であると考えられた。そこで、AH 2 分子を短いペプチドを介して連結した AH dimer を作成したところ、合胞体形成阻害活性は 2 倍に上昇した (表 2)。

各セグメントの QXW モチーフの Q を A に置換すると、それぞれの変異体で活性低下の度合いが異なっていた。さらに、糖鎖と相互作用していると考えられる Y 残基 (Y23、Y61 及び Y99) を A に置換した場合も同様な傾向が見られた (表 3)。このことから、各セグメントの gp120 に対する親和性は異なっていると予想された。そこで、各セグメントのアミノ酸配列を統一した変異体を作成した。まず、活性低下の大きかったセグメント 1 を構成する 1 番目から 38 番目のアミノ酸配列を 3 つ繋げたところ、合胞体形成阻害活性は 1/20 以下に低下した。このことは、糖鎖結合ポケットを形成していると考えられる LD-QXW モチーフ以外の配列は各セグメントを適切に配置させるのに必要であり、これを壊してしまったために活性が低下したと考え

られた。そこで、ポケット形成に参与していると考えられる LD-QXW モチーフ間のみを各セグメントのそれに統一した AH を作成した。その結果、LD-QXW モチーフ間をセグメント 1 のアミノ酸配列で統一した変異体は AH の 2 倍の合胞体形成阻害活性を有することを確認した (表 4)。

D. 考察

(1) AH の糖鎖認識機構

エンドグリコシダーゼ H または 1,2- α -マンノシダーゼ処理した gp120 に対して AH は結合性を失うことから、AH は gp120 上の HM 中に存在する $\alpha(1-2)$ mannose 部分を認識して結合することが分かった。一方、シアリダーゼ及び β -ガラクトシダーゼで処理することによりコンプレックス型およびハイブリッド型糖鎖の末端に存在するシアル酸やガラクトースを除いたところ、AH との結合性の減少は認められなかったが、むしろ結合が増加する傾向が見られたことから、これらの糖鎖を除くことでより AH がより HM に結合しやすくなるのではないかと考えられる。

AH と糖タンパク質との結合を他のレクチンと比較した結果、AH は他のレクチン同様 gp120 に対しては 10^{-8} オーダーの強い親和性を示したが、HM が 1 つしかない RNase B については結合が認められなかった。一方、AH とフリーの糖鎖との結合を Frontal affinity chromatography

(FAC) により測定を行った (独立行政法人産業技術総合研究所 糖鎖工学研究センター糖鎖構造解析チームに依頼) 結果から、AH は HM 中の Man $\alpha(1\rightarrow2)$ Man 結合のうち図 7 に示した Man9 構造の D1 や D3 に位置する Man $\alpha(1\rightarrow2)$ Man 結合が存在することで親和性が強くなり、Man9 で最も強い親和性 ($K_D=3.8\times 10^{-4}$ M) を示すことがわかった。ところが、 $\alpha(1-2)$ mannobiose との親和性を測定した結果も $K_D=5.8\times 10^{-4}$ M となり Man9 と同程度の解離平衡定数を示し、分子間相互作用解析で得られた AH と gp120 との親和性 (K_D) と比較すると非常に弱いことが分かった。一方、CV-N に関しては $\alpha(1-2)$ mannobiose および Man9 への親和性を isothermal titration calorimetry で測定した結果が報告されており、それぞれ $K_D=1.5\times 10^{-6}$ M および 6.7×10^{-9} M で約 1000 倍の差があることから AH の場合は明らかに違いのあることが分かった。また、AH の活性必須領域における各セグメント 1 ア

ミノ酸変異体の合胞体形成阻害活性評価の結果から、セグメント 1 つに変異を入れた場合に比べ、セグメント 2 つ以上に変異を入れた場合に相乗的に活性が低下することが明らかになっている。これらのことから、CV-N は HM 1 本に対して強く結合できるのに対し、AH は 3 つの糖鎖結合部位が糖タンパク質上の複数の HM に結合することで初めて強い親和性を発揮し (クラスター効果)、その結果 gp120 の様に糖鎖に富んだ糖タンパク質に選択的に結合することができると考えられた。

DC-SIGN と gp120 の結合に対する AH の影響については、若干の阻害効果が認められたものの、AH の抗 HIV 活性を発揮する濃度に比べ高濃度であるため実際の阻害効果は低いものと思われる。

(2) AH の接着・侵入阻害機構

CD4 発現細胞と gp120 の結合に対する AH の影響を免疫沈降法により検討した結果から、AH はこれらの結合に直接的には影響しないことが分かった。また、シュードタイプウイルスを用いた感染実験の結果からも、AH の抗 HIV 作用は gp120 と CD4 の結合より後の段階で発揮されることが考えられた。しかし、細胞にウイルスと AH を同時に添加した場合に十分量の AH が gp120 に結合しているならば、後から AH を添加した時と同程度の抗ウイルス活性が発揮されるのではないかとこの疑問が残る。この疑問点を考察するにあたり、AH のクラスター効果による gp120 との結合を考慮すると、gp120 が CD4 と結合した後に立体構造の変化を起こすことで AH がより強く効果的に gp120 に結合することが出来る糖鎖配置が現れることが予想され、そのため 4 C でウイルスと AH を同時添加した場合に抗ウイルス活性が減弱してしまったのではないかと推察している。

(3) AH の高活性変異体

AH の糖鎖との結合部分を増やすことにより高活性の AH 誘導体を作成することに成功した。また、AH の各セグメントの糖鎖結合能力は均等ではなく、セグメント 1 の trimer (His Seg-1 trimer) の合胞体形成阻害活性は元の His-AH より 2 倍の活性を示した。今後、この高活性 AH 誘導体の二量体を作成することで、より強力な活性を示す誘導体を得られることが期待される。また、当研究室では AH に Tag を付けずに

発現できる放線菌を用いた組み換え AH の生産方法を確立しており、この方法を用いて、活性の上昇した AH の大量調製が可能になるものと期待される。

E. 結論

- 1) AH は高マンノース型糖鎖の末端に存在する $\alpha(1-2)$ mannose を認識して結合することが明らかとなった。
- 2) AH は 3 つの糖鎖結合部位が糖タンパク質上の複数の高マンノース型糖鎖に結合することで初めて強い親和性を示し (クラスター効果)、gp120 の様に糖鎖に富んだ糖タンパク質に選択的に結合することができると考えられ、CV-N とは異なる糖鎖認識機構を持つことが明らかとなった。
- 3) 天然型より強い合胞体形成阻害活性を有する AH 誘導体を創製することができた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H. Chiba, J. Inokoshi, H. Nakashima, S. Omura and H. Tanaka
Actinohivin, a novel anti-human immunodeficiency virus protein from an actinomycete, inhibits viral entry to cells by binding high-mannose type sugar chains of gp120 *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316, 203-210 (2004)
 - (2) K. Shiomi, R. Matsui, M. Isozaki, H. Chiba, T. Sugai, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, T. Chiba, H. Yan, Y. Kitamura, W. Sugiura, S. Omura and H. Tanaka
Fungal phenalenones inhibit HIV-1 integrase *J. Antibot.* 58(1), 70-73 (2005)
- ##### 2. 学会発表
- (1) 菅井隆弘、千葉春美、猪腰淳嗣、田中晴雄、松尾一郎、伊藤幸成、大村智 抗 HIV タンパク質アクチノヒビンは $\alpha(1-2)$ mannose 側鎖を認識する 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 2004.10.13-16
 - (2) 高橋淳、猪腰淳嗣、千葉春美、大村智、田中晴雄 gp120 high-mannose 型糖鎖と結合する抗 HIV 蛋白質 actinohivin の活性必須領域の解析 第 77 回日本生化学会大会 (横浜) 2004.10.13-16
 - (3) A. Takahashi, J. Inokoshi, H. Chiba, S. Omura

and H. Tanaka Analysis of essential regions for biological activities of the potent anti-HIV protein actinohivin that binds to high - mannose sugar chains of gp120. *GMBIM/BMP* (San Diego, CA) 2004.11.14-18

(4) 高橋淳、猪腰淳嗣、千葉春美、大村智、田中晴雄 放線菌由来抗 HIV 蛋白質 actinohivin の高活性変異体の調製 日本薬学会第 125 年会 (東京) 2005.3.29-31

(5) 千葉春美、菅井隆弘、猪腰淳嗣、大村智、田中晴雄 抗 HIV タンパク質 actinohivin の gp120 高マンノース型糖鎖への結合 日本薬学会第 125 年会 (東京) 2005.3.29-31

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特願 2004-346644

抗 HIV 薬、これを構成するポリペプチド、ポリペプチドをコードする遺伝子、抗 HIV 薬の製造方法 発明者：田中晴雄、猪腰淳嗣、大村智
出願人：北里学園

2. 実用新案登録

該当なし

【図表】

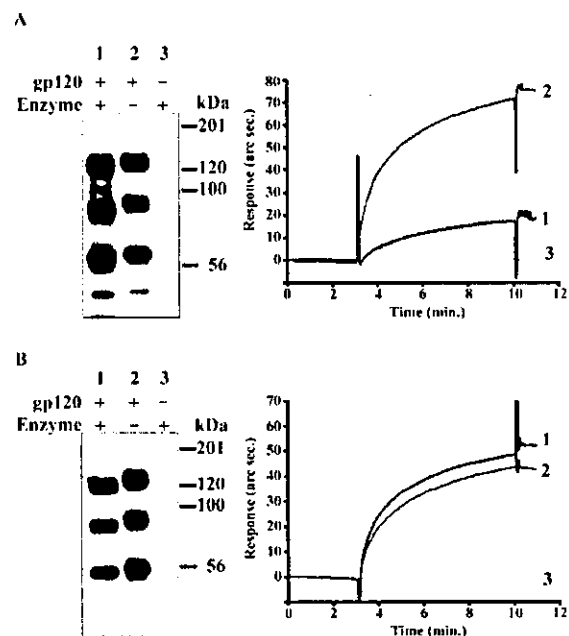


図1 1,2- α -mannosidase (A)、シアリダーゼと β -ガラクトシダーゼ (B) 処理した gp120 と AH との結合性の変化

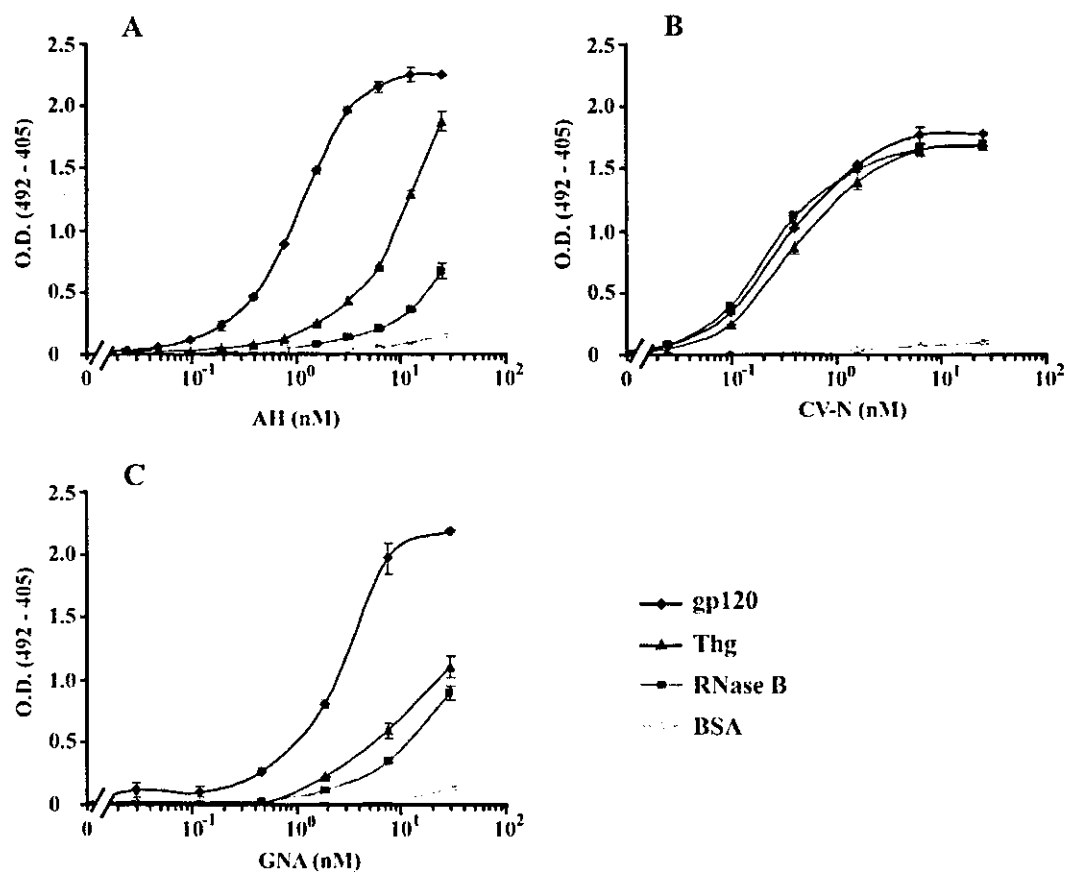


図2 各種糖タンパク質に対するレクチン (AH (A)、CV-N (B)、GNA (C)) による結合性の違い

表1 AHの各種糖タンパク質に対する親和性

AH			
Protein	Kass($M^{-1}S^{-1})(10^4)$	Kdiss($S^{-1})(10^{-2})$	Kd(M)(10^{-6})
NL4-3 sgp120	4.23 ± 0.86	1.37 ± 0.21	3.43 ± 1.29
SF162 sgp120	5.93 ± 1.12	1.40 ± 0.35	2.43 ± 0.67
RNaseB	$10^3 >$	n.d.	n.d.

CVN			
Protein	Kass($M^{-1}S^{-1})(10^3)$	Kdiss($S^{-1})(10^{-1})$	Kd(M)(10^{-5})
NL4-3 sgp120	1.43 ± 0.12	0.26 ± 0.12	1.73 ± 0.71
SF162 sgp120	1.47 ± 0.15	0.36 ± 0.12	2.50 ± 1.06
RNaseB	0.84 ± 0.05	2.47 ± 1.94	3.03 ± 2.57

GNA			
Protein	Kass($M^{-1}S^{-1})(10^3)$	Kdiss($S^{-1})(10^{-1})$	Kd(M)(10^{-5})
NL4-3 sgp120	2.27 ± 0.35	1.22 ± 0.24	5.40 ± 1.61
SF162 sgp120	2.67 ± 0.21	1.50 ± 0.10	5.60 ± 0.53
RNaseB	0.64 ± 0.25	16.33 ± 7.09	28.0 ± 17.6

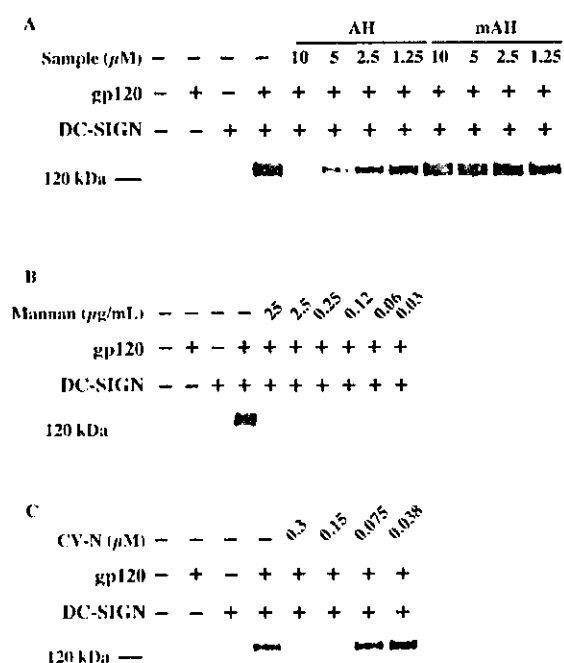


図3 DC-SIGN発現細胞の gp120 結合活性に対する AH (A)、yeast mannan (B) および CV-N (C) の影響