

平成17年度 厚生労働科学研究研究費補助金
エイズ対策研究事業
課題番号 H16-エイズ-004

HIV の増殖・変異の制御に関する研究

総括・分担研究報告書

平成18年3月

主任研究者 佐藤 裕徳
(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長)

研究組織

研究者名	分担	所属	役職
佐藤 裕徳	班長	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター	室長
高橋 秀宗	班員	国立感染症研究所・感染病理部	室長
駒野 淳	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
西澤 雅子	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	研究官
村上 努	班員	国立感染症研究所・エイズ研究センター	主任研究官
明里 宏文	班員	医薬基盤研究所・霊長類医学研究センター	リーダー
小島 朝人	班員	国立感染症研究所・感染病理部	室長
久保 嘉直	班員	長崎大熱帯医学研究所・エイズ感染防御分野	助手
櫻木 淳一	班員	大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染制御分野	助手
原田 信志	班員	熊本大学大学院・医学薬学研究部感染防御分野	教授
森川 裕子	班員	北里大学附属北里生命科学研究所・ウイルス感染制御学研究室	教授
服部 俊夫	班員	東北大大学院・医学系研究科感染症呼吸器病態学分野	教授
間 陽子	班員	理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット	ユニットリーダー
増田 貴夫	班員	東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科免疫治療学分野	助教授
岡本 尚	班員	名古屋市立大学院・医学研究科生体機能分子医学細胞分子生物学	教授
増田 道明	班員	獨協医科大学・微生物学講座	教授
足立 昭夫	班員	徳島大学大学院・ヘルスパイオサイエンス研究部ウイルス病原学	教授
生田 和良	班員	大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野	教授
三隅 将吾	班員	熊本大学大学院・医学薬学研究部薬学生化学分野	助教授
高折 晃史	研究協力者	京都大学医学研究科 血液・腫瘍内科学	助手

目 次

I. 総括研究報告書	
1. 総括研究報告書	1
主任研究者：佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)	
II. 分担研究報告書	
柱1. HIV 変異制御研究	
1. 中和逃避と定方向進化に関わる因子の探索	5
主任研究者：佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)	
2. HIV 増殖・変異の制御に関する研究	9
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)	
3. HIV-1 マトリックス蛋白質のウイルス感染前期過程における役割	15
分担研究者：村上 努 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
4. HIV ゲノム二量体化とウイルス感染初期過程	19
分担研究者：櫻木 淳一 (大阪大学微生物病研究所・ウイルス感染制御分野)	
5. ゲノム安定性制御の研究	23
分担研究者：高橋 秀宗 (国立感染症研究所・感染病理部)	
6. 薬剤耐性変異獲得 HIV プロテアーゼの増殖適応能の結晶構造学的 解析研究	27
分担研究者：西澤 雅子 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)	
7. 新たな IKK 阻害剤 ACHP による潜伏感染細胞からの HIV 複製の抑制作用	31
分担研究者：岡本 尚 (名古屋市立大学院・医学研究科細胞分子生物学)	
柱2. HIV 複製制御研究	
(i) 侵入制御の研究	
1. HIV-1 細胞侵入制御：脂質二重膜流動性制御因子の探求	39
分担研究者：原田 信志 (熊本大学大学院・医学薬学研究部感染防御分野)	
2. グリチルリチンの PCP/AIDS 由来 HIV-1 株 (SDA-1) 感染阻止効果機構の解明	43
分担研究者：服部 俊夫 (東北大学大学院・医学系研究科感染病態学分野)	
3. HIV-1 の細胞侵入過程の検討	47
分担研究者：小島 朝人 (国立感染症研究所・感染病理部)	
4. HIV-1 感染における ERM ファミリー蛋白質の関与	51
分担研究者：久保 嘉直 (長崎大熱帯医学研究所・エイズ感染防御分野)	

柱 2. HIV 複製制御研究 (続)	
(ii) 初期過程制御の研究	
5. Vpr 結合因子の検索	55
分担研究者：間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット)	
6. HIV-1 ゲノム動態に關与する宿主因子	59
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)	
(iii) 転写制御の研究	
7. HIV-1 複製に關わる宿主因子の同定とその機能解析	65
分担研究者：生田 和良 (大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野)	
(iv) 複製後期過程の制御	
8. HIV-1 粒子形成機構と宿主因子	69
分担研究者：森川 裕子	
(北里大附生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室)	
(v) アクセサリー蛋白質の制御	
9. Vif 機能制御 (Vif およびその結合因子の構造機能解析)	75
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)	
10. HIV-1 Vif 機能制御：Vif 新規機能探索	79
分担研究者：明里 宏文 (医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センター)	
11. HIV-1 Vpr 機能制御：Vpr 誘導細胞周期異常の機構解明	83
分担研究者：増田 道明 (獨協医科大学・微生物学講座)	
(vi) ウイルス粒子のプロテオーム解析	
12. HIV粒子のプロテオーム解析	85
分担研究者：三隅 将吾	
(熊本大学大学院・医学薬学研究部薬学生化学分野)	
APOBEC3 ファミリーによる抗レトロウイルス自然免疫と HIV-1 Vif の機能	89
研究協力者：高折 晃史 (京都大学医学研究科・血液 腫瘍内科学)	
III. 業績一覧 (2005)	93

I. 総括研究報告書

HIV の増殖・変異の制御に関する研究

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者：佐藤 裕徳（国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター）

研究要旨

当該年度は、3年計画の2年目にあたる。

【背景】世界の HIV 感染者は 4,000 万人を超え、日本への感染拡大が危惧される。公衆衛生上の安全を確保するには抗 HIV 薬とワクチンを必要とするが、決定的なものは無い。さらに HIV は自然界で容易に変異するため、一旦確立した予防治療法においてもその効果を維持することは難しい。

【目的】HIV の増殖と変異に関する基礎研究を行い、新たな予防治療法の開発と有効性の確保に繋がる科学情報を収集する。

【方法】18名の研究者で複製・変異の素過程を分担し、HIV の増殖・変異に関わる調節因子を特定し、構造生物学的手法を取り入れて作用機構を解析する。

【進捗状況】現在までにそれぞれ独自の候補因子を特定し、複製と変異における意義を検証している。

分担研究者（18名）

高橋 秀宗（国立感染症研究所）
村上 努（国立感染症研究所）
駒野 淳（国立感染症研究所）
西澤 雅子（国立感染症研究所）
明里 宏文（国立感染症研究所）
小島 朝人（国立感染症研究所）
櫻木 淳一（大阪大微生物病研究所）
久保 嘉直（長崎大熱帯医学研究所）
増田 貴夫（東京医科歯科大学大学院）
三隅 将吾（熊本大学大学院）
間 陽子（理化学研究所）
森川 裕子（北里生命科学研究所）
増田 道明（獨協医科大学）
原田 信志（熊本大学大学院）
服部 俊夫（東北大学大学院）
岡本 尚（名古屋市立大学大学院）
生田 和良（大阪大微生物病研究所）
足立 昭夫（徳島大学大学院）

研究協力者

高折 晃史（京都大学）

A. 研究目的

世界の HIV 感染者は 4,000 万人を超え、日本への感染拡大が危惧される。このような状況下で国民の公衆衛生上の安全を確保するには、抗 HIV 薬とワクチンを必

要とする。しかし未だ決定的なものは無く、開発に必要な国内の HIV 増殖研究基盤も欧米諸国と比べると脆弱である。さらに HIV は自然界で容易に変異するため、一旦確立した予防治療法においてもその効果を維持することは難しい。そこで本研究班では、HIV の増殖と変異に関する基礎研究を系統的に行う体制を国内に確保し、新たな HIV 感染予防治療法の開発と有効性の維持に繋がる科学情報を収集する。

B. 研究方法

本研究では、HIV の増殖と変異の2つの研究の柱を設定し、構造生物学的手法を取り入れて基礎研究を行う。得られた成果から新たな予防治療法の開発ならびにそれらの有効性の確保に繋がる科学情報を整理収集する。

柱 1. HIV 増殖研究：HIV の増殖に必要な調節因子を特定し、その働きを選択的に制御すれば特異性の高い抗 HIV 薬ができる。決定的な因子を特定できれば、学術と臨床に大きなインパクトを与える。世界で競合する研究分野だが、国内で系統

的に研究する体制が無い。そこで平成16年度に国内の複製研究者18名と連携して当該研究班を立ち上げた。柱1では、HIVの複製を(i)吸着・侵入、(ii)脱殻・ゲノムRNA逆転写・プロウイルス核内輸送と染色体組み込み、(iii)プロウイルス転写、(iv)Gag細胞質輸送・ゲノム二量体化・集合・出芽に分け、分担して調節因子と調節機構の解明を目指す。柱2. HIV変異研究：HIV変異の調節因子を特定し、その働きを選択的に制御すれば、変化能や複製能が破綻し弱毒化すると推察される。ウイルスの変異は学術と臨床双方に重要な課題でありながら、世界の基礎研究は少なく科学的に議論できる基盤は脆弱である。そこでまず国内の研究基盤を確保することを目指し、柱1でゲノム変異と組換えに関連する研究者を中心に柱2を立ち上げた。柱2では、(i)逆転写酵素と(ii)ゲノムRNAの機能調節因子と調節機構の解明を目指す。立体構造研究：柱1、2で特定した細胞因子やウイルス分子の立体構造がわかれば、作用機構の理解に役立ち、特異性の高い抗HIV薬ができる。そこで国内のHIV研究に(i)計算科学解析と(ii)X線結晶構造解析を適用するための基盤づくりに取り組む。

(倫理面への配慮)

ヒト由来材料(血液)を使う場合は、所属機関倫理審査会の審議を受け、提供者の承諾とプライバシーの保護に万全を期した。動物実験は行っていない。

C. 研究結果

昨年に引き続き、HIV増殖と変異に関わる調節因子の探索と生理的意義の検証を行った。分担研究の主な進捗状況は以下のとおりである。

柱1. HIV増殖研究

① HIVの細胞侵入に、感染受容体と細胞骨格のリンカー蛋白質エズリンとモエシン(久保)および細胞膜とHIVエ

ンベロープ蛋白質の流動性(原田)が関わること、コレステロール様構造を持つグリチルリジンが抗ウイルス活性を示すこと(原田)、CCR5を介する感染を特異的に抑制すること(服部)がわかった。

② HIVの逆転写反応の進行に、インテグラーゼと相互作用する細胞因子Gemin2が関与することがわかった。

(増田貴)。Gagマトリックス蛋白質と結合し、逆転写反応の進行に関与する可能性のある細胞因子tRNAシンセターゼを同定した(村上)。Nefが脱殻に関わる可能性を示唆した(小島)。

③ HIVのマクロファージ感染に重要なVpr-importin α 相互作用を阻止する低分子化合物を同定した(間)。

④ HIV-1転写を阻害する細胞因子RNF125を同定した(生田)。IKK阻害剤がNF- κ Bを介する転写とHIV増殖を抑制することがわかった(岡本)。

⑤ 酵母でGag細胞質輸送と集合・出芽に関わる細胞因子として同定されたSyntaxinが、ヒト細胞(HeLaと293T)でも同様の機能をもつことがわかった(森川)。

⑥ VprはWee1機能昂進を介してG2 arrestを誘導すること(増田道)、VifとGagの一部がHIV-1の種特異性の決定に重要である事(足立)、VifのN末端領域がGag成熟抑制効果をもつこと(明里)、などがわかった。

⑦ 粒子内に5種類のp24 isoformがあること、R5とX4ウイルス特異的細胞因子があることがわかった(三隅)。

⑧ siRNAライブラリーを用いてHIV-1産生の昂進と抑制に働く細胞遺伝子11種を同定した(生田、RNAi社との共同)。

柱2. HIV変異研究

① トポイソメラーゼIが組換えを抑制し完全長cDNAの合成を促進すること、組換えの前段階である粒子成熟にも関

わることがわかった。(高橋)。

- ② ゲノム二量体化は複製初期過程の進行に影響を与えること、二量体化シグナル内 SL1 のループ部分塩基が組換え効率の決定因子であることがわかった(櫻木)。
- ③ 計算機解析と実験を組み合わせ、逆転写酵素のアロステリック調節因子 ATP の競合阻害剤候補を同定した(佐藤)。
- ④ 新たな RNaseH 活性測定系をつくり、逆転写酵素の薬剤耐性変異は RNaseH 活性の変化をもたらすことを示した(駒野)。
- ⑤ 自然界で R5 ウイルスが優勢となるための選択優位性をもたらす HIV-1 core element を同定した(佐藤:研究協力者 長縄聡=日本大学医学部先端医療科学)。

立体構造研究

- ① 計算科学: 実験と同程度の精度の分子モデルを構築する計算環境をつくり、治療薬と薬剤耐性変異が HIV 変異率の変化を誘起するしくみ、Env Gp41 変異が膜融合活性を調節するしくみ、HIV-1 亜株がプロテアーゼ阻害剤の一部に低感受性となるしくみ、などを説明した。(佐藤:研究協力者 横山勝=国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター)。
- ② 結晶構造解析: HIV-1 CRF01_AE プロテアーゼホモダイマー(西澤/Massachusetts Univ.)、Vif-Elongin 複合体(足立/理化学研究所)、Vpr-Importin α 複合体(間/理化学研究所)、CRF01_AE 逆転写酵素ヘテロダイマー(佐藤)の結晶化を試みている。

協力研究

APOBEC3G は、HIV-1 Vif-Cullin5-Elongin B-Elongin C 複合体によりユビキチン化されること、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) に対しても抗ウイルス活性を示すことなどを世界で初めて証明した。

D. 考察

主な分担研究成果の学術的意義および新たな HIV 制御法開発との関連は以下のとおりである。

- ① HIV-1 の細胞侵入には、感染受容体とエンベロープ蛋白質が脂質二重層で局所集合・多重結合し、一定サイズの fusion pore が形成されることが必要と推察される(久保、原田)。局所集合におけるリンカー蛋白質の関与を明確にすれば世界初の成果であり、細胞侵入メカニズムの理解が大きく進むとともに新たな薬剤標的分子候補が提供される。
- ② 感染細胞における逆転写反応の進行は、多彩な分子で cis と trans に制御されていると推察される(増田貴、高橋、櫻木、村上、佐藤)。増田貴らの研究は、インテグラーゼの新たな作用点を特定し、関与する細胞因子の HIV 複製における意義を明らかにした点で学術的水準の高い成果と言える。感染細胞における HIV ゲノム逆転写の調節機構の理解と薬剤開発に繋がるインテグラーゼ/Gemin2 複合体構造の解明を期待する。
- ③ HIV-1 転写抑制因子として同定された RNF125 はアミノ酸配列の相同性からユビキチン化を進める E3 ligase と推定される(生田)。通常は翻訳産物の分解に関わるユビキチン化と HIV 転写抑制は単純には結びかず、未知の転写制御機構の存在を示唆する。メカニズムの解明は学術的に重要で、HIV 転写制御治療薬の開発にも結びつく可能性がある。
- ④ HIV-1 出芽に後期エンドゾームの class E Vps 蛋白質 (TSG101 など) の関与が示唆されている。しかし、これらのみでは出芽は説明できず、未知の細胞因子群の関与が推察される。実際に森川らの結果は初期-後期エンドゾーム因子の関与を示す。森川らの酵母

出芽系は世界に類例はなく、Gag 輸送・集合・出芽に関わる調節因子群とその制御機構の全容を解明する有力な手法といえる。研究の発展は、当然、HIV 複製後期を標的とする新規阻害薬開発に結びつく。

- ⑤ HIV-1 アクセサリー蛋白質群は生体におけるウイルス増殖と免疫逃避への関与が示唆されている。持続感染と病態進行に重要な関わりをもつと推察されるが、蛋白質機能の調節は不明な点が多い。本研究班でのアクセサリー蛋白質群への多角的な取り組み（間、足立、増田道、明里）は、調節機構解明と新薬開発の基礎となる。特に生体環境下での HIV 増殖の理解に結びつく成果を期待する。
- ⑥ 近年、細胞因子群の網羅的解析が可能となってきた。siRNA ライブラリーを用いた増殖関連遺伝子の検索（生田）、精製 HIV 粒子のプロテオーム解析（三隅）により、HIV 増殖に関わる新たな細胞因子の特定とその調節機構解明に結びつく成果を期待する。
- ⑦ HIV は、容易に変異して抗ウイルス薬やワクチンの効果を無力化する。一方、この変異性が破綻するとウイルスの複製能や変化能が破綻し、弱毒化する可能性が高い。逆転写酵素とゲノム RNA の調節機構研究（佐藤、高橋、櫻木、駒野）は、ウイルスの変異性（変異と組換え）に介入する方法を開発し、治療薬やワクチンの有効性を確保するための基礎を提供する。世界の研究は少なく科学的に議論できる基盤はまだ脆弱であるため、基礎情報の蓄積を目指す。
- ⑧ 計算機を用いて高精度分子モデルを構築する手法の適用（佐藤）は、分子の働きを理解するためと創薬に有用である。岡本らもその重要性に着目し、同様の環境設置を試みている。X 線結晶構造解析の共同研究（間、足立、西

澤、佐藤）も同様の意義をもち、より正確な構造情報が期待される。計算機と実験による関連蛋白質の構造機能研究の基盤を研究班の中につくることで、本研究班で特定する調節因子の理解が深まり、特異的阻害剤を開発する環境が整うと期待する。

E. 結論

(1) 進捗状況：本研究は、計画に従い、順調に進展している。各分担項目で複数の調節因子候補を特定し、その生理的意義の検証に進んだ。計算科学を適用した研究の成果がウイルス学の学術誌に共著で採択され、結晶構造解析についても国内最高水準にある理化学研究所との共同研究が始まった。

(2) 成果の意義：結果と考察、論文成果に示すように、各分担研究は HIV 増殖と変異の理解に寄与し、学術的意義がある。考察に示すように、研究成果は新規抗 HIV 薬を開発する科学的基盤を提供する。これは公衆衛生上の安全確保に繋がり、社会的意義も高い。

(3) 展望：引き続き、HIV 増殖と変異に関わる調節因子の探索と生理的意義の検証を行う。構造生物学的手法の適用範囲を広げる。3年間の研究で得られた成果から、新たな予防治療法の開発とその有効性の確保に繋がる主要な科学情報を整理収集する。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

業績一覧参照。

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

服部（HIV-1 分離株 SDA-1：AY902478）、生田（HIV 転写制御因子：特願 2005-083826）、岡本（NF- κ B 活性化抑制剤：特願 2005-22759）、間（HIV-1 感染阻害物質：予定）、三隅（HIV 粒子蛋白質：予定）。

II. 分担研究報告書

1. HIV-1 の中和逃避と定方向進化に関わる因子の探索

佐藤 裕徳 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター
研究協力者：長縄聡、北村勝彦 横浜市立大学医学部・公衆衛生学教室
横山勝 国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター

研究要旨：HIV-1 感染の自然史における謎の一つに、R5 ウイルスの優勢がある。ウイルスのコレセプター使用域を決める Gp120 V3 は高度可変領域として知られる。HIV-1 の高変異性を考慮すれば、本来は多様なコレセプター指向性ウイルスが出現してよい。しかし、実際は、感染後 10 年前後にわたり R5 ウイルスしか出現しない。我々は、感染者ウイルス由来の V3 をもつ一連の V3 組換え体の中和感受性を解析した。その結果 CCR5 使用のみを規定する V3 (R5I V3) をもつと、ウイルスは感染者 V3 抗体の中和に低感受性になることを見いだした。この発見は、自然界で R5 ウイルスが優勢となること、R5 ウイルスの V3 配列が比較的均一なこと、Gp120 ワクチンの効果が低いこと、など免疫存在下でのウイルスの選択と進化を説明する。またワクチン株選定の理論的根拠を与える。

A. 研究目的

HIV V3 は Gp120 コアの表面に位置し、35 アミノ酸のループ構造をとる。このため、免疫原性が高く、ほとんど全ての感染者で V3 抗体が産生される。V3 はまた、ブリッジングシートとともにコレセプターとの結合に関わり、ウイルスの細胞侵入に必須の役割を果たす。このため、抗体の主要中和エピトープを形成する。したがって、HIV が持続感染を成立するには、V3 抗体を逃避する必要がある。

よく知られる逃避機構は、抗原変異である。V3 ではアミノ酸変化につながる非同義置換が高頻度におきる。しかし、我々は、抗原変異説では説明できない現象を見いだした (Sato H. 1999 J. Virol 73:3551-9., Shiino T. 2000 J. Virol 74:1069-78)。すなわち、CCR5 を規定する能力をもつ V3 (R5 V3) は、感染全期に持続するにも関わらず非同義置換の蓄積がほとんど認められない。一方、CXCR4 を規定する能力をもつ V3 (X4 V3) は、免疫不全を発症した後にのみ認められするにも関わらず、非同義置換が同義置換より優位に蓄積していた。これらの観察結果か

ら、X4 V3 は抗原変異で V3 抗体による中和を逃避するのに対し、R5 V3 は変異を伴わずに回避できると推察した。本研究では、この可能性を実験的に検証した。

B. 研究方法

(1) **血漿：**1993-2003 年の間に 17 名の HIV-1 CRF01_AE 感染者から計 20 の血漿サンプルを得た。

(2) **ウイルス：**感染者ウイルス由来の V3 をもつ V3 組換え体 DNA は HIV-1_{LAI} クローンを鋳型に overlap extension 法により計 30 種作製した (Sato, H. 1999 *Virology* 257, 491-501., Kato, K. 1999 *J Virol* 73, 5520-6 Shiino T. 2000 *J. Virol* 74:1069-78)。ウイルスは、DNA を HeLa 細胞に導入して作製した。

(3) **V3 抗体価の測定：**V3 中央の主要中和エピトープを含む 19 アミノ酸を化学合成し、96 穴プレートにコートした後、ペプチド ELISA を行った。血漿の希釈系列を調製してペプチドと反応させた後、結合した抗体を抗ヒト IgG-パーオキシダー

で検出した。

(4) 中和力価の測定：血漿の中和力価の測定は MAGIC5 細胞を用いた。血漿の希釈系列を調製してウイルスと 1 時間反応させた後、MAGIC5 に感染させた。感染後 48 時間における青色細胞の数を数えた。血漿未処理ウイルスの感染価を 50% に低下させる中和力価を 1ND₅₀ とした。

(5) V3 配列多様性の解析：HIV-1 CRF01_AE V3 領域の塩基配列計 589 種は Los Alamos HIV sequence database から入手した。アジアの 7 カ国の 1990-2000 における配列を用いた。コレセプター使用域の情報が付加されている 45 の配列について、Nei and Gojobori の方法で同義置換率 (*ds*) と非同義置換率 (*dn*) を求めた。また計 589 の配列をアミノ酸配列に変換し、pair-wise comparison によりアミノ酸の相同性を計算した。

C. 研究結果

(1) V3 抗体低感受性を示す V3 サブセットの同定 (図 1、2)

X4 V3 をもつ組換え体は、V3 抗体価に依存して中和された (図 1、X4 V3 subset, $r = 0.32$, $P = 1.5 \times 10^{-6}$, Spearman's rank test)。一方、R5 V3 をもつ組換え体は、高い抗体価においても中和抵抗性であった (図 1、R5 V3 subset)。

組換え体の V3 を次の 4 つのグループに分けた。① CCR5 使用のみを規定し、V3 糖鎖付加部位をもち、V3 荷電が +4 以下 (R5I)、② CCR5 使用のみを規定し、V3 荷電が +5、あるいは V3 糖鎖付加部位をもたない (R5II)、③ CXCR4 使用を規定し、V3 糖鎖付加部位をもつ (X4I)、④ CXCR4 使用を規定し、V3 糖鎖付加部位をもたない (X4II)。その結果、V3 抗体価あたりの中和力価 (ND₅₀/OD₄₅₀) は、R5I が他の V3 より有為に低かった (図 2)。

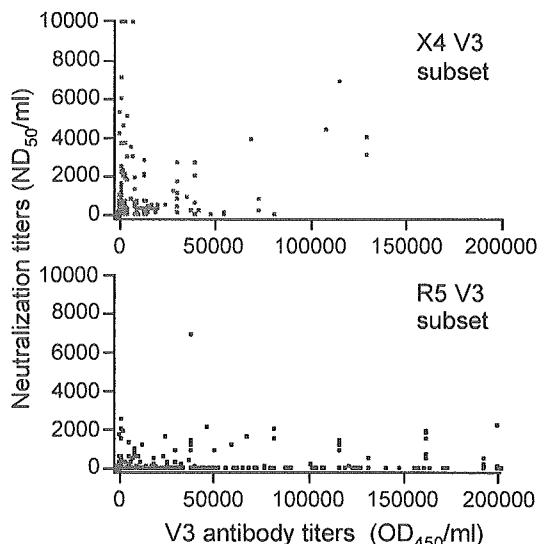


Fig. 1. Sensitivities of V3 recombinants to the V3 antibodies. Each dot indicates plasma neutralization titer against HIV-1_{LAI} recombinant having CRF01_AE V3 element (ordinate) and antibody titer against the recombinant V3 sequence (abscissa). Plasma samples are from CRF01_AE infected individuals.

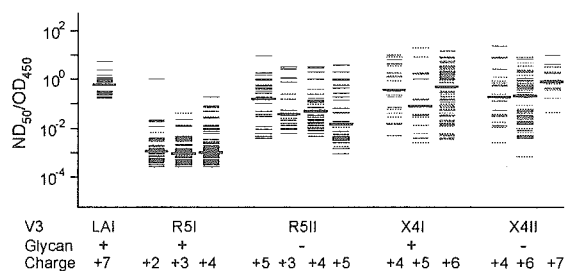
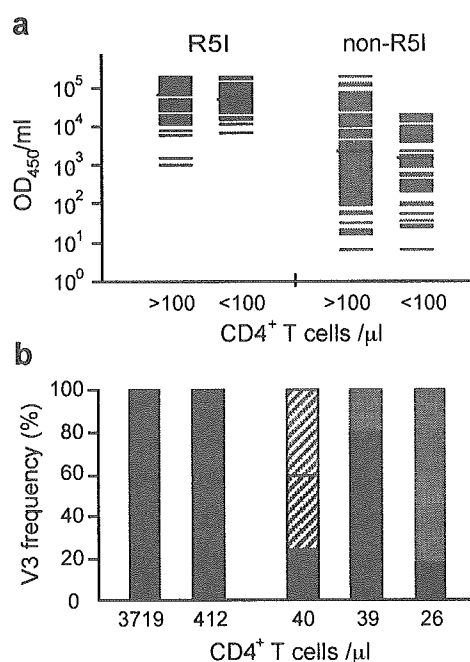


Fig. 2. Identification of a V3 subset for neutralization resistance. The R5 and X4 V3 subsets are divided into indicated sub-subsets according to their competence for carbohydrate modification and net positive charges (See text and Supplementary Fig.1b). Distributions of the ND₅₀/OD₄₅₀ ratios for the R5 V3 and X4 V3 sub-subsets are shown. Black bars indicate medians.

(2) 病態悪化に伴う V3 抗体価の低下と X4 V3 の出現 (図 3)

V3 の結合抗体価は、17名の感染者の CD4 陽性細胞数が 100/μl より低くなると有為に低下した ($P=5.6 \times 10^{-4}$ [R5I V3], 6.5×10^{-6} [non-R5I V3])。特に、non-R5I V3 に対する抗体価で顕著な低下が認められた (図 3a)。

3名の感染者で V3 配列の変化を解析した。R5I は CD4 陽性細胞数に依存せず検出された (図 3b, R5I)。一方、R5I 以外の V3 は、CD4 陽性細胞数が 100/μl より低下したときのみ検出された。



Changes in V3 antibody titer and V3 genotype upon CD4⁺ T cell depletion. **a**, Changes in V3 antibody titers among CRF01_AE infected individuals. Higher titers of antibodies directed at the non-R5I V3 sequences are preferentially lacked in the plasma samples from patients with CD4⁺ T cell counts of less than 100/μl. Black bars indicate medians. **b**, Changes in V3 genotype in representative individuals. R5I V3 sequences (blue) persist in the patients independent of CD4⁺ T cell depletion, whereas R5II (hatched blue), X4I (magenta), and X4II (hatched magenta) V3 sequences emerge only after marked CD4⁺ T cell depletion.

(3) V3 配列の多様性 (図 4)

公開データベースの R5 ウイルスの V3 で、非同義置換の抑制が認められた (図 3a, R5 V3)。一方、X4 ウイルスの V3 では、非同義置換が有為に生じていた (図 3a, X4 V3)。

R5I V3 のアミノ酸は、Gp120 保存領域のひとつである C2 と同程度に保存されていた (図 3b, R5I)。

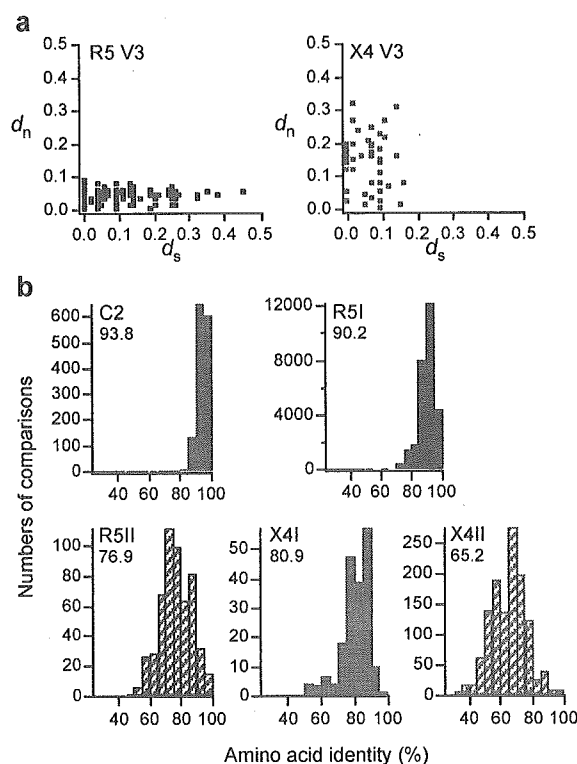


Fig. 4. V3 diversity in epidemic sites. **a**, Distributions of nonsynonymous (d_n) (ordinate) and synonymous (d_s) (abscissa) substitutions within the CRF01_AE R5 and X4 virus V3 sequences are estimated with the Los Alamos HIV sequence database. **b**, Percent identities of two independent amino acid sequences of the CRF01_AE strains were calculated with pair-wise comparisons within the indicated sequence sets from the Los Alamos HIV sequence database. Inlet numbers indicate mean values of percent identities. The histograms show that the R5I V3 in Asia is as homogeneous as the constant region (C2) of the CRF01_AE envelope Gp120.

D. 考察

本研究により、HIV-1は、R5I V3をもつとV3抗体の中和に低感受性になることがわかった。メカニズムは不明で今後の課題だが、例えば以下の可能性を考えている。ウイルス粒子Gp120三量体において、R5I V3の中和エピトープは、隣接するGo120のV1V2により隠されている。Non-R5I V3では負に帯電する糖鎖が無い、あるいは塩基性アミノ酸が増加するなどにより正荷電が増す。これにより、V3とV1V2の静電的反発力が増し、中和エピトープが露出される。静電的反発力の増加は、また、Gp120-Gp41親和性を低下させ、粒子表面のGp120密度低下を招く事で抗体感受性を増すかもしれない。

本研究の発見は、HIV-1感染の自然史の謎を理解するための基盤を与える。第一に、自然界でR5ウイルスが優勢となること、X4ウイルスが免疫不全を発症したときのみ優勢となりうることを矛盾無く説明する。第二に、自然界ではR5ウイルスV3は高度可変領域ではないこととその理由を矛盾無く説明する。第三に、これまでに開発されたR5ウイルスGp120ワクチンの効果が低い理由を説明する。またワクチン株選定の理論的根拠を与える。

E. 結論

HIV-1は、R5I V3をもつとV3抗体の中和に低感受性になることがわかった。この発見は、HIV-1感染の自然史の謎を理解するための基盤を与える。すなわち自然界でR5ウイルスが優勢となること、自然界でR5ウイルスのV3の相同性が高いこと、などを矛盾無く説明できる。またR5ウイルスGp120ワクチンの効果が低いことも説明する。さらにワクチン株選定の理論的根拠を与える。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chen, R., Yokoyama, M., Sato, H., Reilly, C., and Mansky, LM. Human immunodeficiency virus mutagenesis during antiviral therapy: impact of drug-resistant reverse transcriptase and nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors on human immunodeficiency virus type 1 mutation frequencies. *J Virol.* 79(18): 12045-12057, 2005.
- 2) Kinomoto, M., Appiah-Opong, R., Brandful, JA., Yokoyama, M., Nii-Trebi, N., Ugly-Kwame, E., Sato, H., Ofori-Adjei, D., Kurata, T., Barre-Sinoussi, F., Sata, T., and Tokunaga, K. HIV-1 proteases from drug-naive West African patients are differentially less susceptible to protease inhibitors. *Clin Infect Dis.* 41(2): 243-251, 2005.
- 3) 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.* 79(10): 5996-6004, 2005.

2. 口頭発表

- (1) 久保嘉直、吉居廣朗、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹：HIV-1の細胞内侵入におけるエズリンの関与。第53回ウイルス学会総会、2005年1月20～22日、横浜。
- (2) 横山 勝、守 宏美、中村浩美、佐藤裕徳：計算科学と分子遺伝学の解析手法を用いた HIV-1 逆転写酵素 ATP 結合部位の検討。第19回日本エイズ学会総会、2004年12月1～3、熊本。

H. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金 エイズ対策研究事業

2. 研究課題：HIV 増殖・変異の制御に関する研究 課題番号：H16-エイズ-004

分担研究報告書

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 第3室 主任研究官）

分担研究課題 逆転写酵素機能制御の研究

研究要旨

大腸菌由来の精製酵素を用いて逆転写酵素活性の酵素学的特性を解析する実験系を樹立した。患者由来の薬剤耐性ウイルスを対象とした研究により、NRTI 耐性を誘導する非 RNase H ドメインへの挿入変異・点変異によって RT 活性だけでなく RNaseH 活性も減少することが明らかとなった。両酵素活性低下は並行して変化することから、NRTI 耐性獲得と *in vivo* における選択には逆転写酵素活性の変化が同調する必要があるという Pathak らの dynamic copy choice モデルとよく一致することが示唆された。HIV-1 感染者体内で抗レトロウイルス療法が薬剤耐性変異ウイルスを発生させる過程における RNase H 活性の関与が明らかとなった。p66 homodimer と p51/p66 heterodimer では RNase H 活性が異なるが polymerase 活性は影響しないことが示された。各酵素活性の独立性の評価と薬剤耐性能との比較により、新たな治療 strategy を提示することが出来るかもしれない。一方、HIV-1 の逆転写酵素に結合する宿主因子を同定する方法を確立し、その候補遺伝子を検索中である。

A. 研究目的

HIV-1 の逆転写酵素 RT の機能を調節する細胞因子がいくつか知られているが、RT に直接結合しその活性を制御するものは未だ知られていない。昨年度、我々は HIV の RT 活性を阻害する因子がほ乳類動物細胞、酵母細胞、大腸菌細胞抽出液中に存在することを示した。今年度は、この生化学的特徴を手がかりに、ヒト細胞に由来する RT に結合する活性阻害因子の同定を試みる。当研究を通じて、細胞に存在する RT 阻害因子をウイルスがいかなる機構で逃れるのかを解明し、HIV 感染の分子機序を理解する一助としたい。この機構を人為的に制御することにより、効果的にウイルス感染を防ぐことが出来るかもしれない。

一方、逆転写酵素は RT 活性の他に RNase H 活性を有している。ウイルス複製に RNase H 活性は必須である。しかし、その活性の強弱がウイルスの複製、薬剤耐性獲得などにどのような寄与をしているのかは未だ不明な点が多い。当研究班には RT の機能を解析するツールとして RNase H 活性を定量的に計測する系が存在しない。班研究に利するため、今年度は RNase H 活性を定

量する系を新たに樹立し、retrovirus 間の RT 酵素活性の相違、薬剤耐性株における RNaseH 活性の特徴等を検討した。

B. 研究方法

HIV-1 の RT に Flag epitope tag をつけてほ乳類細胞発現プラスミドを構築した。これを 293 細胞に transfection し、IGEPAL0.5%存在下で細胞を溶解し、RT とその相互作用因子を anti-Flag agarose beads にて免疫共沈させ、LC-MS にて RT に結合する抑制因子の同定を試みた。同定された遺伝子をほ乳類細胞発現プラスミドにクローニングして、RT と相互作用するかを IP-Western にて確認する。もし相互作用するならば、その結果 RT 活性が阻害されるかを解析する。

RNaseH 活性を定量的に計測する系を確立するため、大腸菌に逆転写酵素を発現させこの精製を行った。HIV-1 の逆転写酵素を大腸菌発現ベクターにクローニングしたものを大腸菌 B 株由来の BL21(DlysS)にトランスフォームする。100mL の大腸菌培養に IPTG を添加して逆転写酵素の発現を誘導する。洗浄と遠心を 3 回繰り返し、

lysis/binding buffer に大腸菌を懸濁し、超音波にて菌体を粉砕する。遠心して菌体を除いた後、His-Trap カラムを装着した Amersham Pharmacia の Acta にて His-tag 逆転写酵素を精製する。HIV-1 の逆転写酵素は 2 量体で、large subunit p66 と small subunit p51 からなる。RNaseH ドメインは p66 にしかない。p66 の homodimer、p51 の homodimer、p66/p51 の heterodimer をそれぞれ作成するが、それらは生成の過程で自然に 2 量体化するので、heterodimer に関しては菌体を 2 種類まぜる他、特に操作しない。精製した逆転写酵素は、RNA-dependent DNA polymerase 活性にて標準化する。

RT 活性の測定は、 ^{32}P -dTTP が oligo dT と poly A の mixture を鋳型として高分子核酸に取り込まれるかを定量した。反応条件は標準的なプロトコールによるため詳細を略する。また、種々の dNTP 存在かでの RI 取り込みも定量した。一方、dNTP 存在下で逆転写酵素を反応させ、反応産物をポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、sybrgreen にて可視化する方法を開発した。

RNaseH 活性を測定する反応条件は一般的に 50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 2-6mM MgCl₂, 2-5mM DTT であるが、文献により 50mM NaCl のかわりに 80mM KCl を使用する。また ATP 存在化で活性の上昇が見られることから、複数の ATP 濃度を検討し、最適な反応条件を得る。基質にも特異性があると考えられるので、異なる基質を準備し、それぞれ反応効率を測定する。RNaseH の基質となる DNA、RNA、DNA-RNA chimera は委託にて合成し、熱変成後室温にゆるやかに冷却することにより対合させたものを用いる。FAM 蛍光標識をオリゴの末端に付加し酵素を反応させ、反応生成産物を Urea 含有変性ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、蛍光ラベルされた RNA が分解される過程を経時的モニターする。最適反応条件にて MLV と HIV-1 の逆転写酵素および薬剤耐性逆転写酵素の基質特異性・種特異性を比較・検索した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

LC-MS にて予備的に RT に結合する抑制因子の同定を試みたところ、次の 3 種類の遺伝子産物が同定された。(1) carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase (CAD)、(2) solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 4 (SLC25A4)、(3) PRP19/PSO4 homolog である。これらに V5 epitope tag をつけて発現ベクターを作成し、ほ乳類細胞における蛋白質の発現を確認した。さらに HIV-1 RT と共にヒト由来 293 細胞に発現させ、IP-Western して RT との結合を確認しようとしたところ、これを検出することが出来なかった。

RNaseH 活性を計測する系を確立した。興味深い点は、図 1 に示すように、レトロウイルスの違いによって基質特異性が大きく異なることである。DNA/RNA heteroduplex を基質にした場合、HIV-1 の逆転写酵素は効率よくこれを認識して RNA を分解した(図 1)。ところが MLV の逆転写酵素はこれを基質にすることが出来なかった(図 1)。我々は環境中からの RNase 混入による実験結果のかく乱を避けるため、RNA プローブを DNA と RNA のキメラ核酸にデザインした。このプローブは 26 塩基の中央 6 塩基のみが RNA である。DNA/chimeric nucleic acid heteroduplex を基質にした場合、MLV の逆転写酵素は効率よくこれを認識したが、HIV-1 の逆転写酵素は反応しなかった(図 1)。中央 12 塩基が RNA である DNA/chimeric nucleic acid heteroduplex を基質にした場合、MLV も HIV-1 の逆転写酵素もこれを基質と認識し反応した。

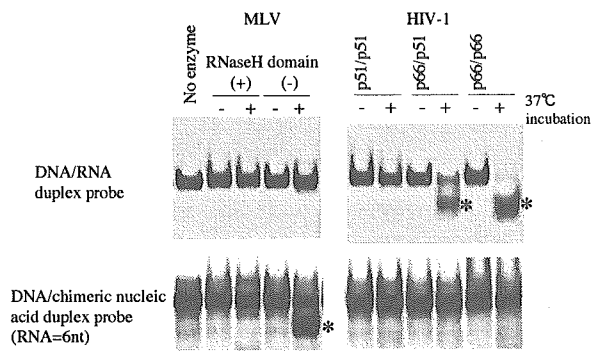


図1 MLVとHIV-1逆転写酵素のRNaseH活性の相違(I)

抗エイズ化学療法にて選択された多剤耐性ウイルスがコードする逆転写酵素耐性変異を人為的に導入した RT 変異体二種類の RNaseH 活性を試験した。これらは J Virol. 2001 Jun;75(12):5604-13 に Sato らが報告した

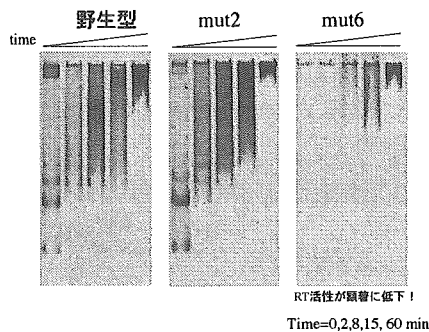


図2 HIV-1多剤耐性逆転写酵素のRT活性の相違

多剤耐性ウイルス由来の RT で、mut1 は 3 つの点変異 M41L, L210W, T215Y (AZT 中等度耐性)、mut2 は 11 アミノ酸挿入変異 (3TC 中程度耐性) をもち、mut6 は挿入変異と同時に 4 つの点変異 M41L, T69I, L210W, T215Y (NNRTI 高度耐性) をもつ。これらは複製能が野生型 WT に比較してそれぞれ 39%, 18% に低下している (J Virol 2001)。我々の解析では、精製酵素の RT 活性は野生型に比べてそれぞれ約 90, 60, 30% に低下していた。この低下率は p66 homodimer と p51/p66 ではほぼ変化なかった (図 2)。一方、RNase H 活性は野生型 WT に比較して Mut2, Mut6 はそれぞれ

れ ATP 非存在下で約 42%, 27% 以下に、ATP 存在下で約 27%, 27% 以下に低下していることが明らかとなった (図 3 左)。中央 12 塩基が RNA である DNA/chimeric nucleic acid heteroduplex を基質にした場合それぞれ ATP 非存在下で両方とも約 2% に、ATP 存在下で約 20%, 2% に低下していることが明らかとなった (図 3 右)。ATP 存在下で mut2 の RNaseH 活性は有意な活性増強を見ることが出来たが、WT と mut6 にはそのような活性を見いだすことは出来なかった (図 3 右)。また、p66 homodimer の RNase H 活性は WT と Mut 間で著変を認めなかった。

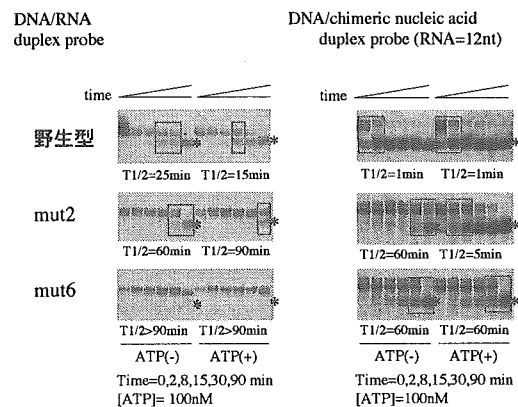


図3 HIV-1多剤耐性逆転写酵素のRNaseH活性の相違

D. 考察

ほ乳類発現ベクターに導入した RT は逆転写活性を持つ機能的蛋白質であったが、LC-MS を利用した蛋白質相互作用因子の同定においては、方法論が非常に高感度であるため、contaminant が検出された可能性が否定できない。試料調整の条件を検討し再度候補遺伝子の同定を試みる。

RNase H 活性解析結果は HIV-1 と MLV の逆転写酵素の RNase H 活性には基質認識メカニズムの違いが存在することが明らかとなった。これが核酸の長さ、配列特異性、構造特異性によるものか更なる解析を行う。

薬剤耐性ウイルス由来の変異酵素を用いて、新たな RNase H 活性減弱変異を同定することが出来た。mut2 はウイルス複製能力が野生型ウイルスに比較して約 39% に低下し、polymerase 活性は 60% に、RNase

H 活性は 30% にそれぞれ低下し、3TC にのみ薬剤耐性を示す。Mut6 はウイルス複製能力が約 18% に低下し、polymerase 活性は 30% に、RNase H 活性は 27% にそれぞれ低下し、3TC にのみ薬剤耐性を示す。文献によると、これまで RNase H 活性に影響する RT の点変異は NNRTI に対する点変異しか知られていない (P236L, J Virol 1999; V106A, J Virol 2000)。以上から、当研究により RTI 耐性を誘導するアミノ酸変異が非 RNase H ドメインへの変異であったとしても、ウイルスが選択されるためには polymerase 活性と同時に RNase H 活性も並行して活性が低化する必要があることが示唆された。Pathak らの提唱する dynamic copy choice model に consistent な finding である。実際ウイルス-細胞を使用した fidelity assay では Mut と WT で変異率に変化がなかったこと (Chen et al., 2005 J Virol) も Pathak らのモデルを指示する。今後このモデルの妥当性を検証しつつ、酵素活性の制御メカニズムを解明し、治療方法開発に示唆を得られるように解析を進めたい。

病原性、相同組換えによる新たな株間組み換えウイルスの発生に RNase H 活性が大きく関与していることが近年指摘されている。たとえば、HIV には HIV-1 と病原性の弱い HIV-2 が存在する。HIV-2 の RNase H 活性は HIV-1 のそれに比べると弱いことが証明された (Sevilya Z, et al., J Mol Biol. 2001 Aug 31;311(5):957-71)。一方、エイズ治療に用いられている非ヌクレオシド型逆転写酵素阻害薬 (NNRTI) に対する耐性ウイルスには、RNase H 活性が減弱した変異株が存在する (Nikolenko GM, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 8;102(6):2093-8)。我々の研究成果は RNase H 活性の違いがもたらす HIV-1 の複製能力や病原性に対する影響や、逆転写阻害剤に対する耐性獲得メカニズムなどを解明するための糸口になると期待される。

E. 結論

HIV-1 の逆転写酵素に結合する宿主因子を同定する方法を確立し、その候補遺伝子

を検索中である。RNase H 活性の酵素学的特性を解析する実験系を樹立し、これを利用し NRTI 耐性ウイルス由来の精製酵素の polymerase 活性と RNase H 活性が parallel に変動すること、これが in vivo におけるウイルス survival に重要な影響を及ぼすことが示唆された。MLV と HIV 由来の酵素を比較すること、および p66 homodimer と p51/p66 heterodimer の活性を比較することにより、RNase H 活性は未知の制御メカニズムが存在する可能性が示唆された。

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

1) Miyuchi 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. 2005 Apr; 79(8): 4720-4729

2) Komano J, Futahashi Y, Urano E, Miyuchi K, Murakami T, Matsuda Z, Yamamoto N.

The Interaction of HIV-1 with the Host Factors.

Jpn J Infect Dis. 2005 Jun; 58(3): 125-30.

3) 山本直樹、松田善衛、村上努、駒野 淳
AIDS の新たな治療標的を求めて : HIV-1 の宿主因子
実験医学 Vol.23 No.13 2068-2073 2005

4) Kosuke Miyuchi, Rachael Curran, Erin Matthews, Jun Komano, Tyuji Hoshino, Naoki Yamamoto, Don M. Engelman and Zene Matsuda.

Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp41 can inhibit membrane

fusion and incorporation of Env onto virions.
(in press)

2. 学会発表

1) May 24-29 Miyauchi K, Curran R, Komano J, Murakami T, Yamamoto N, Engelman DM, Matsuda Z. The rotational phase of the localized region of gp41 membrane-spanning domain alpha-helix affected the Env biogenesis. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

2) May 24-29 Murakami T, Ablan S, Nagashima K, Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Freed EO, Yamamoto N. Characterization of HIV-1 matrix mutants-Effects on an early stage of infection. Cold Spring Harbor Meeting Retroviruses, CSH, NY, USA

3) Nov 16-17 Jun Komano, Yuko Futahashi, Yasunari, Emiko Urano, Toru Aoki, Kosuke Miyauchi, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Zene Matsuda, Naoki Yamamoto. Identification of SES as an SDF-1alpha-independent internalization motif of HIV-1 co-receptor CXCR4. 10th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim, Hanoi, Vietnam

4) Nov 20-22 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹. HIV-1 感染細胞における Tat を介した P-TEFb の活性化を抑制する細胞内因子の解析. 第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

5) Nov 20-22 篠田知宏、村上努、宮内浩典、駒野淳、磯貝まや、松田善衛、山本直樹. 感染前期過程に欠損を有する変異株を用いた HIV-1 マトリックス蛋白質結合宿主因子の探索. 第 5 3 回日本ウイルス学会学

術集会、横浜

6) Nov 20-22 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛. The function of membrane-spanning domain of HIV-1 gp41 in Env biogenesis. 第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

7) Nov 20-22 駒野淳、二橋悠子、浦野恵美子、貝の瀬由成、青木 徹、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、山本直樹. The non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail regulates the cell surface expression of CXCR4. 第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

8) Nov 20-22 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛. HIV-1 gp41 の膜貫通ヘリックス間相互作用-GXXXG モチーフ変異体の解析. 第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

9) Dec 1-3 駒野淳、二橋悠子、浦野恵美子、青木 徹、貝の瀬由成、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、山本直樹. Cell surface expression of CXCR4 is regulated by a non-tyrosine-based diacidic motif within the cytoplasmic tail. 第 1 9 回日本エイズ学会学術集会、熊本

10) Dec 1-3 村上努、篠田知宏、内藤幸美、宮内浩典、磯貝まや、駒野淳、松田善衛、山本直樹. HIV-1 マトリックス蛋白質のウイルス感染前期過程における役割、第 1 9 回日本エイズ学会学術集会、熊本

11) Dec 1-3 駒野淳、宮内浩典、Lay Myint、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、杉浦互、山本直樹. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a -1 frameshift enhancer sparsomycin. 第 1 9 回日本エイズ学会学術集会、熊本

12) Dec 1-3 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田

善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹. T-type cyclin/CDK9 複合体の活性化を抑制する細胞内因子による HIV-1 複製制御. 第 19 回日本エイズ学会学術集会、熊本

13) Dec 7-10 村上努、篠田知宏、内藤幸美、宮内浩典、磯貝まや、駒野淳、松田善衛、Eric Freed、山本直樹. マトリックス蛋白質変異が HIV-1 感染前期課程や結合宿主因子に与える影響. 第 28 回日本分子生物学会年会、福岡

14) Dec 7-10 宮内浩典、駒野淳、村上努、松田善衛. HIV-1 gp41 の膜貫通領域に存在する GGXXG 配列の解析. 第 28 回日本分子生物学会年会、福岡

15) Dec 7-10 Jun Komano, Yuko Futahashi, Yasunari, Emiko Urano, Toru Aoki, Kosuke Miyauchi, Takeshi Yoshida, Yoshio Koyanagi, Zene Matsuda, Naoki Yamamoto. Identification of SDF-1alpha-independent internalization motif Ser-asp/Glu-Ser within CXCR4's cytoplasmic tail. 第 28 回日本分子生物学会年会、福岡

H. 知的所有権の出願・取得状況（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