

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

の解明と結合宿主因子の探索・同定

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

研究要旨:HIV-1 マトリックス蛋白質 (MA) のウイルス感染前期過程における役割の解析のと MA と相互作用する宿主因子の探索・同定を行い、以下の結果を得た。

1) シュードタイプウイルスを用いた single round 感染系や逆転写過程の各過程を測定するための種々のプライマーを用いたリアルタイム PCR 法の結果から、MA 変異体 49LD、86CS がウイルス侵入後の逆転写に至る過程（いわゆる脱殻）、6VR が逆転写そのものに欠損を有していることが強く示唆された。

2) Tagged-MS 法を用いて MA 強制発現細胞破碎液から MA と相互作用する宿主因子の候補として tRNA シンセターゼ複合体構成メンバーを同定した。

A. 研究目的

HIV-1 マトリックス蛋白質 (MA) は、感染後期過程におけるウイルスのアセンブリー、細胞質膜への targeting、エンベロープ蛋白質のウイルス粒子への取り込みなどに重要であることが知られている。しかしながら、MA のウイルス感染前期過程（特に侵入直後の脱殻、逆転写）における役割についてはまだよくわかっていない。そこで我々は感染後期過程への影響が少ないと考えられる MA 変異体 (6VR、49LD、86CS) を選び、後期過程への影響を検証した後、HIV-1 感染前期過程に対する影響を種々の方法を用いて検討した。また、感染前期過程に欠損を有する変異体ではこの過程に関与する宿主因子と MA との結合親和性が野生型とは異なることが予想される。そこで、MA に結合する宿主因子を MA 強制発現細胞抽出液からの免疫沈降と質量分析の組み合わせで探索し野生型と MA 変異体で比較した。

B. 研究方法

(1) ウイルス増殖カイネティクス測定：

293T 細胞を野生型 (NL4-3)、MA 変異体 (6VR、49LD、86CS、コントロールとしての 20LK) のウイルス分子クローンプラスミドでトランスフェクトして得られたウイルスを種々の T 細胞株 (H9、CEM(12-7)、MT-4) に感染させ、培養上清中の p24 量を測定することにより上記ウイルスの増殖カイネティクスを測定した。

(2) ウイルス産生細胞と産生ウイルスの生化学的解析：野生型、MA 変異体ウイルスプラスミドを 293T 細胞にトランスフェクトし、細胞破碎液、産生ウイルス破碎液を SDS-PAGE 後、HIV 患者血清、各種抗 HIV 蛋白質抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

(3) Single round 感染系：ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として組込んだ Env 蛋白質欠損組換えウイルスプラスミドと HIV-1 Env (または Amphi-tropic MuLv Env, VSV-G) 発現ベクターをコトランスフェクトして得られたシュード (タイプ) ウイルスを各種細胞株に感染後、感染細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性を測定することにより

single round 感染系におけるウイルスの感染価を求めた。

(4) 感染細胞中のウイルス DNA 合成の測定：野生型、MA 変異体ウイルスを感染させた T 細胞から尿素法により DNA を抽出し、逆転写過程の各過程を測定するための種々のプライマーを用いてリアルタイム PCR 法により定量解析を行った。

(5) MA と相互作用する蛋白質の探索・同定：C 末端に FLAG タグを付加した野生型、MA 変異体 (20LK)、復帰変異体 (20LK/73EK/82AT) の MA 発現プラスミドを 293T 細胞に強制発現させ、細胞破碎液を抗 FLAG 抗体で免疫沈降し、共沈してくる蛋白質を MALDI/TOF-MS で解析後 MS-Fit によるデータベース検索により目的蛋白質を同定した (Tagged-MS 法)。抗体が入手可能なものについてはウエスタンブロッティングによる確認も行った。また、293T 細胞に強制発現させた MA から結合宿主蛋白質を除いたものを 293T 細胞または H9 細胞破碎液と混合してから抗 FLAG 抗体で免疫沈降する方法も試みた。

(倫理面での配慮)

該当事項なし。

C. 研究結果

(1) ウイルス増殖カイネティクス測定：いずれの MA 変異体も T 細胞株において野生型に比べ H9、CEM(12-7)細胞では顕著な、MT-4 細胞では数日の増殖の遅れを示した。遅れて増殖してきたウイルスの多くは復帰変異体であると推定された。また、これまで追加変異による復帰変異体がとれなかった 49LD に対して復帰変異体候補として 34VI/49LD が見出された。

(2) ウイルス産生細胞と産生ウイルスの生化学的解析：感染後期過程におけるウイルス蛋白質の合成、プロセッシング、ウイルス粒子のアセンブリーでは 6VR がわずかなプロセッシング阻害を示した他は顕著な欠損は認められなかった。また、産生されたウイルス蛋白質の性状において野生型と MA 変異体の間に明確な違いは認められな

かった。

(3) Single round 感染系：

HIV-1 Env、Ampho-tropic MuLv Env、VSV-G の3つのエンベロープ蛋白質でシュードタイプしたウイルスの Single round 感染における感染価を比較することにより、今回使用した3つの MA 変異体がウイルス侵入後のどの過程に欠損を有するかを検討した。6VR は NL4-3Env でシュードタイプしたウイルスで野生型の約 10%の感染価を示し、その欠損は Ampho-tropic MuLv Env、VSV-G のいずれのエンベロープ蛋白質でシュードタイプしても回復しなかった (コントロールとして使用した 20LK と同様の結果) (図 1)。これに対して、49LD、86CS は NL4-3Env でシュードタイプしたウイルスで野生型 s の約数%の感染価を示し、その欠損は Ampho-tropic MuLv Env では回復しなかったが、VSV-G のエンベロープ蛋白質でシュードタイプすることによってほぼ野生株並みに回復した (図 1)。

(4) 感染細胞中のウイルス DNA 合成の測定：6VR は初期逆転写産物量にほとんど影響はなかったが、後期逆転写産物量の減少が認められた (コントロールとして使用した 20LK と同様の傾向)。一方、49LD と 86CS は初期、後期逆転写産物のどちらの逆転写産物量も顕著に減少していた (図 2)。以上の結果は、6VR と 49LD、86CS がウイルス侵入後の異なる過程に欠損を有していることを示唆している (図 3)。

(5) MA と相互作用する蛋白質の探索・同定：野生型 MA と相互作用する蛋白質として、蛋白質生合成などに関与し、超分子複合体を形成する一群の tRNA シンターゼ複合体構成メンバーが同定された (図 4)。この中には HIV-1 逆転写に使用される tRNA^{Lys} と結合するリジル tRNA シンターゼも含まれていた。これらの酵素と MA の相互作用は逆転写過程に欠損を有する変異体 20LK、復帰変異体 20LK/73EK/84AT では野生型に比べて顕著に弱かった (図 5)。また、これらの酵素と MA との相互作用は、RNase 処理により顕著に減少し、その結合

が RNA に依存していることが示唆された。この MA と tRNA シンセターゼ複合体構成メンバーとの相互作用は、293T 細胞に強制発現させた MA から結合宿主蛋白質を除いたものを 293T 細胞または H9 細胞破碎液と混合してから抗 FLAG 抗体で免疫沈降する方法によっても観察された (図 6)。その他に MA と相互作用する蛋白質として actin, tubulin といった細胞骨格蛋白質、文献で MA との相互作用の報告のある EF1 α が同定された (図 5、図 6)。

D. 考察

MA 変異体 49LD と 86CS は膜融合から脱殻に至る過程に、6VR は逆転写そのものもしくはそれ以降の過程に欠損を有していることを示唆された (図 3)。過去の報告にもあるように MA がウイルス感染前期過程の異なる部位で重要な役割を演じていることが示された。49LD、86CS はその欠損が VSV-G によるシュードタイプによって回復する点で Nef(-)変異体とよく似ている。この両者の変異によって、欠損をきたしている部位が共通か否かは興味ある検討課題である。さらに、今回検討した MA 変異体は感染前期過程に関与する宿主因子探索のプローブ等としても有用な研究ツールになりうると考えられる。

MA と相互作用する蛋白質の探索・同定においては、現在までに同定した蛋白質と MA との結合がウイルス増殖においてどんな役割を果たしているかを解明していないが、これまでに得られた結果は Tagged-MS 法を用いた免疫共沈法がウイルス蛋白質と相互作用する宿主因子探索に有用である可能性を示した。

E. 結論

1) MA 変異体 49LD, 86CS がウイルス侵入後の逆転写に至る過程 (いわゆる脱殻)、6VR が逆転写そのものに欠損を有していることを示唆するデータを得た。

2) 逆転写に欠損を有する変異体 (20LK)

を用いた tagged-MS による MA と相互作用する宿主因子の探索において tRNA シンセターゼ複合体構成メンバーがその候補として同定された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Komano J., Y. Futahashi, E. Urano, K. Miyauchi, T. Murakami, Z. Matsuda, and N. Yamamoto. The interaction of HIV-1 with the host factors (review).

The Japanese Journal of Infectious Diseases 58 (3): 125-130, 2005

2. 学会発表

1. Murakami, T., Ablan, S., Nagashima, K., Komano, J., Miyauchi, K., Matsuda, Z., Freed, E. O., and Yamamoto, N. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) matrix mutants: Effect on an early stage of infection. May 24-29, 2005, Retroviruses, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.

2. 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。日本ウイルス学会、横浜、2005年11月20-22日

3. 村上 努、篠田知宏、内藤幸美、磯貝まや、宮内浩典、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。日本エイズ学会、熊本、2005年12月1-3日

4. 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。マトリックス蛋白質変異が HIV-1 感染前期過程や結合宿主因子に与える影響。日本分子生物学会、福岡、2005年12月7-10日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

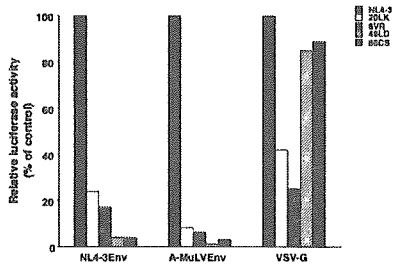


図 1. 種々のウイルス Env 蛋白質を用いたシュードタイプによる MA 変異による欠損の回復の有無

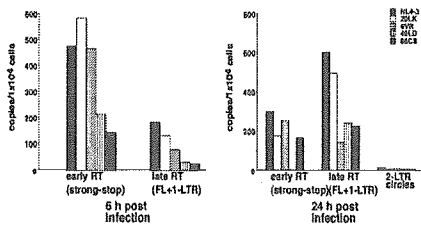


図 2. Real-time PCR による MA 変異 HIV-1 感染細胞 (CEM) における DNA 合成

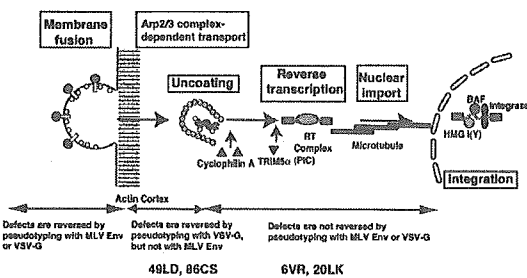


図 3. MA 変異体の HIV-1 感染前期過程における推定欠損部位

- アミノアシルtRNAシンセターゼ: tRNAにアミノ酸を結合する酵素。8種の酵素(下記)が補因子とともに超分子複合体を形成し、統合化された蛋白質合成を担っている。
 - Glutamyl-prolyl-tRNA synthetase (Glu-ProRS)
 - Isoleucyl-tRNA synthetase (IleRS)
 - Methionyl-tRNA synthetase (MetRS)
 - Lysyl-tRNA synthetase (LysRS)
 - Arginyl-tRNA synthetase (ArgRS)
 - Aspartyl-tRNA synthetase (AspRS)
 - Glutamyl-tRNA synthetase (GluRS)
 - Tyrosinyl-tRNA synthetase (TyrRS)
- Tubulin
- Actin
- Translation elongation factor1-alpha (EF1α): アミノアシルtRNAと結合する。

図 4. 質量分析によって同定された MA と相互作用する蛋白質

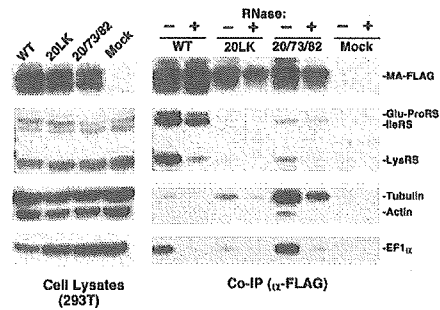


図 5. 野生型または変異体 MA と相互作用する宿主蛋白質 (免疫共沈法)

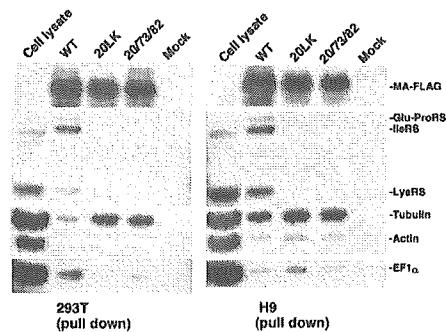


図 6. 野生型または変異体 MA と相互作用する宿主蛋白質 (試験管内で複合体を形成させる方法)

4. HIV ゲノム二量体化とウイルス感染初期過程

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）

研究要旨

分担研究者が独自に構築した、HIV ゲノム二量体化を効果的に検出できるシステム・HIV ゲノム組換えを定量的に算出できるシステムを用いてゲノム二量体化の詳細な解析に取り組んだ。その結果以下のことが現在までに明らかになった。

1, HIV 粒子内で実際に働く二量体化シグナルの必要十分領域は約 140 塩基であった。この領域を用いてゲノム二量体化が不十分な変異体を作成した結果ウイルス増殖の様々なステップに阻害が見いだされ、ゲノム二量体化がウイルス複製の多くのステップに関係している可能性が示唆された。

2, HIV の様々なサブタイプ間のゲノムヘテロ二量体化効率は組み合わせによって様々であった。ゲノム二量体化効率は DLS 全体に依存していたが組換え効率は DLS 内の SL1 という極めて狭い領域に決定されていた。

A. 研究目的

HIV-1 を含むレトロウイルスのポジティブ一本鎖 RNA ゲノムはウイルス粒子内で非共有的に結合して二量体を形成している。これは遺伝子組換えによって子孫に遺伝的多様性をもたらし、また片方のゲノムが傷ついていた時の補償をすることで、生き残りに有利な状況を作り出していると解釈されている。したがって HIV ゲノム二量体化の機序の解明は、遺伝的多様性を主要な生き残り戦略としている HIV の制圧に向けた糸口を示しうる。本研究で分担研究者は、粒子内 HIV-1 ゲノム二量体化をパッケージングと独立した形でとらえて解析することのできる実験系および HIV ゲノム組換え効率を定量できる系を独自に構築した。これらを用いて DLS のウイルス増殖における役割、およびサブタイプ間ゲノムヘテロ二量体化およびゲノム組換えの解析を行った。

B. 研究方法

1. DNA 構築

HIV-1 プロウイルス型プラスミド pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。ゲノムの転写開始点から約 500 塩基分の DNA 断片を切り出し、polyA 付加シグナル

とプライマー結合領域（PBS）を不活化する変異を導入した（ ΔP 断片）。pNL43 の Env 領域に ΔP 断片を挿入した変異体 pDDNBA を作成した。pDDNBA を母体として 5'側あるいは 3'側の E/DLS に様々な変異を導入した一連の変異体を作成した。

HIV-1 各サブタイプの感染性 DNA クローンもしくは分離株の分与を受け、クローン DNA やウイルス感染細胞 DNA より PCR にて各サブタイプの E/DLS をクローニングし、pNL43 とのキメラを作成した。

マウスの表面抗原遺伝子および緑色蛍光蛋白（GFP）を pNL43 の非必須遺伝子領域に組み込んだ組換えウイルスを作成した。これとサブタイプキメラクローンを組み換えてマーカー付きキメラウイルスクローンを多数作成した。GFP は N 末あるいは C 末に変異を導入したものを用いて、この二変異体間で組換えが起こった場合のみ蛍光励起される GFP が発現するようにした。

2. ウイルスの精製

ヒト腎臓由来 293T 細胞にプロウイルス型 DNA をリン酸カルシウム法にてトランスフェクトした。48 時間後に細胞上清に放出されたウイルス粒子をシェークロースクッションを通した超遠心にて回収した。ウイル

スの一部を界面活性剤にてウイルスを溶解、プロテイナーースK処理、フェノール抽出にてウイルス粒子由来 RNA を精製した。トランスフェクトした細胞も同時に回収し、細胞質 RNA を精製した。ウイルス量は p24 抗原 ELISA キットにて定量した。ウイルスタンパクの性状は HIV-1 特異的抗体とウェスタンブロット法にて確認した。

3. ノザンハイブリダイゼーション

回収したウイルス RNA を等分し、25-65℃間の数分で10分間加温したのち非変性TBEアガロースゲルにて泳動した。ナイロン膜に電氣的に転写した後固定し、RNAプローブを用いて HIV-1 ゲノム RNA を可視化した。

4. RNase プロテクション

ウイルス RNA と細胞質 RNA 中の HIV-1 ゲノム RNA を RNA プローブを用いて RNase プロテクションアッセイキットにて定量した。

5. 感染実験

外被蛋白を持ったウイルスを抗原量を合わせて MAGIC5, MT-4 細胞に感染させた。MAGIC5 細胞は感染後 48 時間で固定し、 β -GAL 発色によりウイルスの感染価を測定した。MT-4 細胞は持続感染実験とウイルス逆転写産物定量実験とに用いた。持続感染実験では 3-4 日おきに細胞の上清収集と培地交換を行い、1ヶ月程度のサンプリングの後、上清中の RT を測定、ウイルスの増殖曲線を求めた。ウイルス一過性感染実験では感染後 20 時間に細胞を回収、染色体 DNA および染色体外 DNA を分離精製した後 Taqman 法に基づいてウイルス逆転写・組み込みの各ステップの産物を定量した。

6. 組換え効率測定実験

マーカー付きキメラウイルスクローンを複数 293T 細胞に VSV-G 発現ベクターとコトランスフェクトし、産生ウイルスの感染により発現するマーカーおよび GFP の発現

率を FACS 解析した。マーカーの発現率から組換えの理論的発現率を算出し、実際の GFP 発現率との比較により組換え効率を測定した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮を必要とする研究は行っていない。

C. 研究結果

ウイルス感染における DLS の働き

昨年度までの解析により決定した HIV-1 のゲノム二量体化必要十分領域はわずか 144 塩基であった。この領域を非必須遺伝子である vpr もしくは nef 領域に挿入した変異体を作成し、ヒト T 細胞由来の MT-4 細胞に感染させると野生株よりもかなり遅れて増殖が確認されたが、いずれの変異体も挿入断片を欠落する復帰変異が起こっていた。ウイルスの感染細胞内での逆転写効率・核移行効率はいずれも著しく低下しており、ゲノム二量体化の低下がウイルスの感染初期過程の様々なステップにも影響を及ぼすことが初めて確認された。

HIV-1 サブタイプ間ヘテロゲノム二量体化効率の測定

現在 HIV-1 のサブタイプは 10 種類以上報告されており、それらの組換え体も多数報告されている。HIV ゲノムの易変異性はウイルス病原性や進化に深く関与しており、ゲノムの二量体形成と逆転写時の相同組み換えはその一端を担っていると考えられている。我々の実験系は本来観察することが非常に困難な、異なる株間のヘテロゲノム二量体化を単純化して捉えることが可能であり、ウイルスの変異や進化を理解する上で重要な知見を得られると期待された。サブタイプ間の二量体化効率をパネル化したのが、遺伝的近縁さと効率の間に相関は見られなかった。二量体化に大きな役割を果たすと考えられている DLS 内の SL1 部のみ

を異なるサブタイプに交換した変異体を作成したが、二量体化の主要な表現型は SL1 部に因らないことが明らかとなった。しかしゲノム組換え実験の結果、組換え効率は SL1 部に大きく依存していることが判明した。

D. 考察

研究分担者はこれまで構築してきた独自の解析系を利用して HIV-1 の粒子内ゲノム二量体化のシス因子 (RNA) の必要十分領域を同定した結果、これがわずかに 144 塩基であり、領域近傍および内部に存在する他機能領域はすべて二量体化には不要であることも明らかとなった。同定された必要十分領域をゲノム上に複数配置することで単量体ゲノムを持った変異体を作成することに成功したが、この変異体の感染能はほぼ消失していた。詳細な解析によりこの変異体がウイルス感染初期の複数のステップで効率低下を起こしていることが明らかとなった。このことは HIV にとって二量体化シグナルあるいはゲノム二量体化が感染初期にも重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

またサブタイプヘテロゲノム二量体化および組換え実験の結果からは、DLS 全体がゲノム二量体化には必要である一方でゲノム組換えには DLS 内の SL1 領域が決定的な役割を果たしていることが明らかとなり、ゲノム二量体化のみが組換えの前提にならないという非常に興味深い可能性が示唆された。

E. 結論

以下のことが現在までに明らかになった。

1. HIV 粒子内で実際に働く二量体化シグナルの必要十分領域は約 140 塩基であった。この領域を用いてゲノム二量体化が不十分な変異体を作成した結果ウイルス増殖の様々なステップに障害が見いだされ、ゲノム二量体化がウイルス複製の多くのステッ

プに関係している可能性が示唆された。

2. HIV の様々なサブタイプ間のゲノムヘテロ二量体化効率は組み合わせによって様々であった。ゲノム二量体化効率は DLS 全体に依存していたが組換え効率は DLS 内の SL1 という極めて狭い領域に決定されていた。

F. 研究発表

1. 論文発表

櫻木淳一. レトロウイルス粒子内ゲノム二量体化機構の解析. 蛋白質 核酸 酵素. 50:892-899, 2005

2. 学会発表

1. J Sakuragi. Minimal region which is necessary and sufficient for HIV-1 genome dimerization in virion. 5th International Retroviral NC Symposium. September 18-20, 2005, Montreal, Canada.

2. Jun-ichi Sakuragi, Sayuri Sakuragi, and Tatsuo Shioda. Genome dimerization of HIV-1 and its roles for viral replication. The 5th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Awaji, Japan.

3. HIV-1 感染初期過程とゲノム二量体化 櫻木淳一・塩田達雄 第 53 回日本ウイルス学会学術集会、横浜

4. HIV-1 サブタイプ間ヘテロゲノム二量体化効率の解析 櫻木淳一、塩田達雄 第 19 回日本エイズ学会学術集会、熊本

5. HIV-1 感染初期過程へのゲノム二量体化の影響 櫻木淳一・塩田達雄 第 28 回日本分子生物学会年会、博多

G. 知的所有権の取得状況
なし

図 1

HIV-1 粒子内ゲノム単量体化変異体の増殖阻害様式

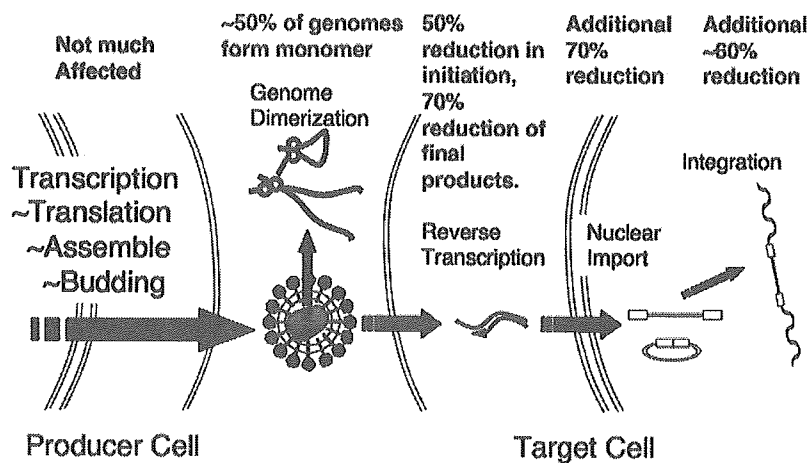
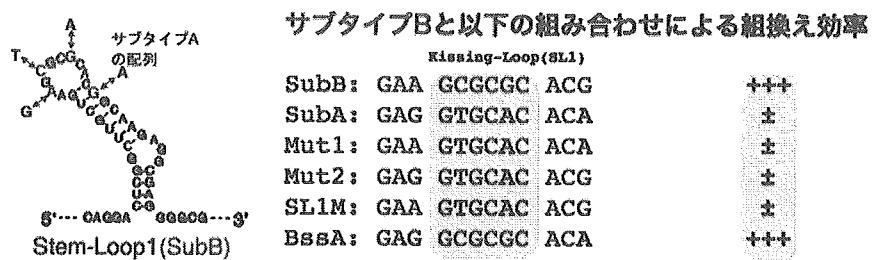


図 2

サブタイプ間組換え効率定量の試み



5. ゲノム安定性制御の研究

分担研究者 高橋秀宗 国立感染症研究所 感染病理部

研究要旨 HIV-1 ゲノム組換えを *in vitro* と感染を用いて観察した。宿主 topoisomerase I は *in vitro* 逆転写アッセイ系において組換えを抑制し完全長 cDNA の合成を促進することが判明した。感染による系で組換えは同一粒子中の RNA ゲノム間で生じ、組換え効率は cDNA 伸長に比例すること、相同なテンプレート間の組換えが主であることが見出された。

A. 研究目的

HIV-1 が宿主免疫系の駆逐から逃れる最大の要因はゲノム RNA の高変異率と高組換え率にある。本研究では組換えを *in vitro* で再現すると共に感染系で組換え効率を測定することにより、組換え機構に影響を及ぼす因子群を明らかにすることを目的とした。

In vitro において合成 RNA と精製逆転写酵素によって乗換えを再現した。

Topoisomerase I を加えることにより逆転写酵素の乗換えへの影響を観測することができると考えられた。

感染を用いた組換え効率の測定系としては薬剤耐性遺伝子を HIV-1 へ組み込んだ系が一般的であるが時間を必要とすることに加え、組換えとは無関係な因子群による幅広い影響を受けやすい、薬剤選別に耐えられる細胞が限定されるという欠点がある。これらの欠点を GFP を使用して克服できると考えた。GFP はポイントミューテーションにより CFP または YFP の波長を示すことが可能であるから HIV-1 の *nef* を CFP または YFP に置換し、組換えにより GFP の波長が出現する事象を利用して組換えの効率を測定できる。組換えが同一粒子中のゲノム間においてのみ生じるかどうか、組換え効率は cDNA 伸長とどのような関係にあるか、ウイルス産生細胞における topoisomerase I ノックアウトの影響を調べることを目的とした。

B. 研究方法

In vitro 逆転写酵素アッセイ

- (ア) HIV-1 の nucleocapsid (NC) 領域 RNA を T7 RNA polymerase にて合成しアクリルアミドゲル泳動によって精製した。
- (イ) アイソトープラベルしたオリゴ DNA をプライマーとし、精製逆転写酵素、dNTP を加え、マグネシウムイオンによって逆転写を開始させた。SDS、EDTA を加え反応停止させ尿素を含むアクリルアミドゲル泳動によって生成 cDNA を解析した(図 1)。

感染による組換えのアッセイ

- (ア) GFP のポイントミューテーション T203Y、Y67W をそれぞれ作成し、YFP、CFP とし、発色を確認した(図 2)。
- (イ) Env を欠き Nef 部分を CFP、YFP、GFP に置換した粒子産生クローン DNA を作成した。
- (ウ) それぞれ 293T 細胞へ VSV-G 発現 DNA と共にトランスフェクションし Jurkat 細胞へ感染させ FACS によって解析した。FACS のバンドパスフィルター、ダイコニックミラーの選択を行った。
- (エ) VSV-G 発現ベクター、CFP、GFP の単独または双方を 293T 細胞へトランスフェクションし、上精の p24 を定量した。

- (オ) 定量した偽ウイルスを Jurkat 細胞へ感染させ、CFP、YFP、GFP の発色を FACS により解析した。
- (カ) siRNA によって topoisomerase I をノックアウトした 293T 細胞で発現された上記偽ウイルスの組換えを FACS によって解析した。
- (キ) 上記 293T 細胞中の HIV-1 プロセッシングをウエスタンブロットにて調べた。

(倫理面への配慮)

本研究では特に臨床試料を使用していない。

C. 研究結果

- (ア) In vitro 逆転写系では topoisomerase I を加えることにより既報どおり、完全長 cDNA の産物が認められた。Topoisomerase I を加えないと、完全長 cDNA 産物はほとんど認められず、数倍長のランダムな長さの cDNA 産生が認められた。
- (イ) バンドパスフィルター3枚、ダイコックミラー1枚の選択によって CFP、YFP、GFP を FACS 上、鑑別することができた。
- (ウ) 感染による組換えアッセイ系では YFP と CFP を発現させる偽ウイルスを同時に感染させても組換えと考えられる GFP を発色する細胞が認められなかった。
- (エ) YFP と CFP を同じ細胞で産生させ、同一中にヘテロなゲノムが存在する偽ウイルスの感染では p24 の濃度に比例して組換えゲノム由来と考えられる GFP の発色を認めた。
- (オ) 相同な遺伝子のポイントミューテーション程度であると組換えは検出可能であったが、赤色、緑色の蛍光蛋白など、大きな遺伝子をそのまま取り込むような組換えは検出できなかった。

- (カ) Topoisomerase I を siRNA によりノックアウトした細胞から得たウイルス組換え効率は特に差がなかった。
- (キ) Topoisomerase I を siRNA によりノックアウトすると HIV-1 プロセッシングが著名に抑制されるが、粒子内のプロセッシングは正常に行われていたことが判明した。

D. 考察

RNA をテンプレートとする cDNA 合成では合成に関わる逆転写酵素以外にテンプレートへ結合し、抑制的にはたらく逆転写酵素の存在が知られている。また topoisomerase I は RNA から逆転写酵素を解離させる。In vitro の逆転写アッセイ系において topoisomerase I 存在下で完全長 cDNA が認められ、topoisomerase I 非存在下では逆転写酵素がテンプレート間をジャンプしたと考えられる長い産物が認められたことから topoisomerase I は抑制的にはたらく逆転写酵素を解離させ乗換えを抑制したと考えられた。

一方、CFP、YFP、GFP は近い波長を有しているがバンドパスフィルターとミラーを組合せ FACS 上、鑑別することができたため、感染によって比較的短時間で組換えをアッセイすることが可能になった。異なる産生細胞から得られた CFP、YFP の偽ウイルスを Jurkat へ重感染させても組換えによる GFP が認められなかったことから、同一粒子中のゲノム間でのみ組換えが生じていることが示唆された。また感染させるウイルス量に比例して組換え効率が上昇し、組換えが cDNA の伸長に依存していることが判明した。組換えは同一粒子中のゲノム間のみで生じるが cDNA の伸長、及び組換えは重感染によって逆転写酵素などが加算され促進されると推測された。またポイントミューテーションを超えた赤色、緑色蛍光蛋白など大きな遺伝子の取り込みは認められなかったことから組

換えにはテンプレートの相同性が大きく影響すると考えた。

Topoisomerase I は *in vitro* において逆転写酵素の乗換えを抑制していたと考えられた。しかし、siRNA により topoisomerase I をノックアウトさせた細胞から得られた偽ウイルスを用いた組換え効率アッセイ系では明確な組換え効率への影響を示すことはなかった。これは topoisomerase I の関与したウイルスが選択的に出芽しているため、組換え効率を大幅に上昇させることはできなかったからであると考えた。siRNA により topoisomerase I をノックアウトさせた細胞では HIV-1 のプロセッシングが抑制されているものの粒子中ではプロセッシングにほとんど影響を及ぼさなかったことも、宿主因子の関与が正常とおり行われている粒子について出芽が選択されていることをサポートしていると考えられた。

E. 結論

Topoisomerase I は *in vitro* 逆転写アッセイ系において組換えを抑制し完全長 cDNA の合成を促進することが判明した。また FACS によって組換え効率を短時間で示すことができた。組換えは同一粒子中の RNA ゲノム間で生じ、組換え効率は cDNA 伸長に比例すること、またテンプレートの相同性が必要とされることが判明した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ichinohe, T., Watanabe, I., Ito, S., Fujii, H., Moriyama, M., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T., and Hasegawa, H. Synthetic double-stranded RNA poly(I:C) combined with mucosal vaccine protects against influenza virus

infection. J. Virol. 79:2910-2919, 2005.

Okada, Y., Suzuki, T., Sunden, Y., Orba, Y., Kose, S., Imamoto, N., Takahashi, H., Tanaka, S., Hall, WW., Nagashima, K., and Sawa, H. Dissociation of heterochromatin protein 1 from lamin B receptor induced by human polyomavirus agnoprotein: role in nuclear egress of viral particles. *EMBO Rep.* 6:452-457, 2005.

Takahashi, H., Maeda, M., Sawa, H., Hasegawa, H., Moriyama, M., Sata, T., Hall, WW., and Kurata, T. Dicer and positive charge of proteins decrease the stability of RNA containing the AU-rich element of GM-CSF. *Biochem Biophys Res Commun.* 340:807-814, 2006.

2. 学会発表

北川善紀 飛梅実 前田才恵 高橋秀宗 佐多徹太郎. FRET による HIV-1 gag と topoisomerase I 相互作用の解析. 第 53 回日本エイズ学会 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特になし
2. 実用新案特許 特になし
3. その他 特になし

図1 Template RNA を乗り換えると template RNA を超えた長さの cDNA が観察される。

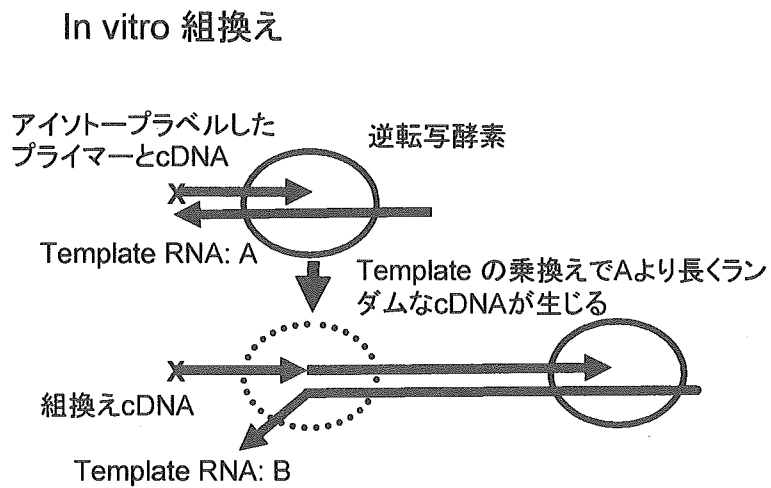
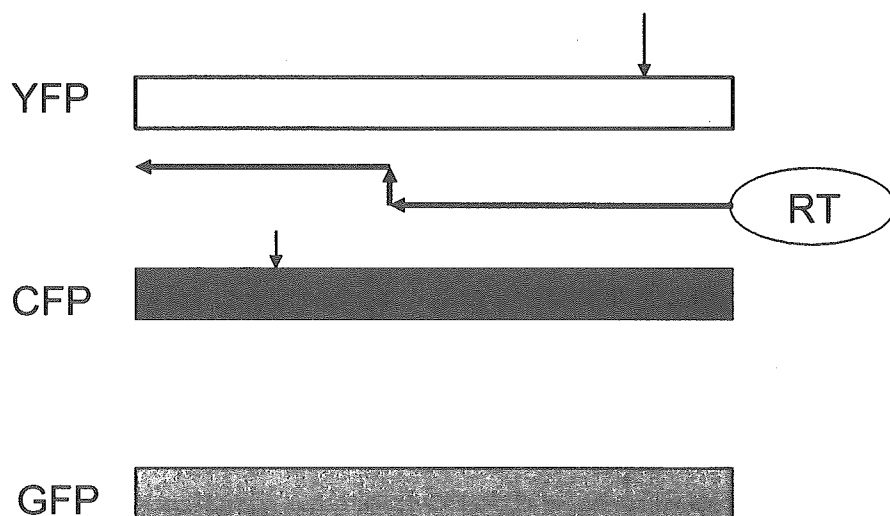


図2 GFP にポイントミューテーションを加え YFP、CFP を作成する。逆転写による組換えが生じると GFP を検出することができる。



6. 薬剤耐性変異獲得 HIV-1 プロテアーゼの増殖適応能の結晶構造学的解析研究

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

研究要旨

HIV-1 CRF01_AE(subtype E)プロテアーゼの結晶構造解析する事を目的とし、CRF01_AE プロテアーゼ遺伝子を *E.coli* にトランスフォームしタンパクを発現させた。プロテアーゼの自己分解を抑制するため 25 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した D25N 変異体及び NFV 耐性との関連が報告されている L10F、N88S を持つ変異体 (D25/L10F、D25/N88S、D25/L10F/N88S) のプロテアーゼを精製し現在結晶構造解析を行っている。また NFV 投薬により L10F、N88S の変異が挿入されたとされる臨床検体由来のプロテアーゼ遺伝子をクローニングし、D25N 変異を挿入しない活性型のプロテアーゼの精製を行った。この臨床検体の解析から、プロテアーゼの構造変化と薬剤耐性獲得のメカニズムについて検討する。

A. 研究目的

多剤併用療法(HAART)導入により HIV 感染症の治療は大きな発展を遂げたがその一方で薬剤耐性ウイルスの出現が治療失敗の大きな要因となっている。既存の抗 HIV 薬は subtype B を標的に開発されており、これまでの薬剤耐性に関する研究も subtype B に関するものが主流であった。現在日本における HIV 流行の主流は欧米と同様 Subtype B によるものであるが、タイなど東南アジアにおける HIV 感染症例の主流の CRE01_AE (Subtype E)による HIV 感染症例は増加傾向にある。これ

までに、Subtype B と CRE01_AE では抗 HIV 薬に対する薬剤耐性獲得に差異があることがすでに報告されているが、これは Subtype B と CRE01_AE の薬剤標的酵素の構造学的差異を示唆するものであり、Subtype B に関してこれまでに蓄積された情報が non-B には必ずしも通用しない事を意味している。また発展途上国への治療支援という観点からも non-B に関して研究を推し進める事は我々にとって重要な課題である。そこで我々は CRE01_AE のプロテアーゼの結晶構造解析を行い Subtype B の構造と比較し

CRE01_AE の薬剤耐性化機序に関する解析を行う事を目的とした。

B. 研究方法

1)プロテアーゼ変異体の構築

野生型プロテアーゼの自己分解活性を抑制するため、まず Subtype B の分子クローンである HXB2 の活性中心の 25 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した D25N 変異体を作製した。また CRF01_AE の分子クローンである NH-1 を元に HXB2 と同様に D25N 変異体を作製した。また NFV 耐性変異 L10F、N88S を導入した変異体 (D25/L10F、D25/N88S、D25/L10F/N88S) を作製した(図 1)。また CRF01_AE で NFV 投与履歴のある臨床症例を 1 症例選択しそのプロテアーゼ領域をクローニングした。この症例は NFV 投与前はプロテアーゼの 88 番目のアミノ酸が野生型のアスパラギンであったが NFV 投与後セリンに、また 10 番目のアミノ酸は NFV 投与前はロイシンであったが NFV 投与後フェニルアラニンに置換している。このように NFV 投与前の野生型プロテアーゼ(L10L/N88N)、NFV 投与によって経時的に N88S を持ったプロテアーゼ(L10L/N88S)及びL10FとN88S 両方を持ったプロテアーゼ(L10F/N88S)を合計 4 ポイント選択しクローニングし

た(図 3)。なおこの臨床症例のプロテアーゼは自己分解能を減弱させるため 7 番目のグルタミンをリシンに置換した(Q7K)。

2)発現ベクターの構築

構築した変異プロテアーゼ遺伝子を pET-11a の T7 プロモーターの下流に組み込んだ。また CRF01_AE の臨床検体由来のプロテアーゼ遺伝子 (L10L/N88N、L10L/N88S、L10F/N88S)をクローニングし pET-11a の T7 プロモーターの下流に組み込んだ発現ベクターも作製した。

3) プロテアーゼタンパクの発現

大腸菌での発現を高めるためヒトの codon usage に適応させた *E.coli* (Rosetta) を使用した。*E. coli* に発現ベクターへトランスフォーム後 IPTG の存在下で 3 時間誘導をかけてプロテアーゼタンパクを強発現させた。

4) プロテアーゼタンパク回収・精製

IPTG による発現誘導後 *E.coli* を回収し French press を用い 110~130Mpa にて菌体を破砕し封入体内のプロテアーゼタンパクを回収した。回収した粗精製産物は 2 M urea で可溶化して封入体を回収し、その後封入体を酢酸で可溶化した。可溶化したプロテアーゼ粗精製物は、G-75 Sephadex を充填した 5 cm x100cm column

に添加し、ゲルろ過による分離精製を行った。流速は 10~15 秒/1 drop に調整し分画採取を行った(図 3)。

C. 研究結果

HXB2 の D25N 変異体、NH-1 の D25N 及び NFV 変異を導入した D25N/L10F、D25N/N88S、D25N/L10F/N88S の 5 種類のプロテアーゼの精製に成功した。現在は共同研究者である Massachusetts Univ. の Dr. Schiffer へプロテアーゼサンプルを送付しハンギング・ドロップ法による結晶化を開始した。また CRF01_AE で NFV 耐性変異である L10F/N88S を持つ臨床検体由来のプロテアーゼ領域を経時的にクローニングし、活性型の状態で大腸菌内での発現を確認し大量精製を開始した。

D. 考察

活性中心の 25 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換し自己分解活性を抑制した D25N 変異体について HXB2、NH-1 共に精製・結晶化は技術的にほぼ完成した。今後は臨床検体の薬剤耐性変異を有するプロテアーゼを用いて解析を進めるが、これらは自己分解活性を持たせたままで解析するため結晶構造解析に必要な大量のタンパクを得る事が難しい。今後は発現ベクターの改良や精製条件の検討などを行い結晶化に必要なタンパクを大

量に精製する条件を決定したい。また大腸菌での発現を最適化するために codon usage を考慮して人工的に合成したプロテアーゼ遺伝子を現在作製しており、これを用いたプロテアーゼ精製を検討している。

E. 結論

Subtype B の分子クローンである HXB2 の D25N 変異体、CRF01_AE の分子クローンである NH-1 の D25N 及び NFV 変異を導入した D25/L10F、D25/N88S、D25/L10F/N88S 変異体の 5 種類のプロテアーゼの大量精製に成功し、結晶構造解析を開始した。活性中心に変異を入れ自己分解能を抑制したプロテアーゼを大量精製する方法を確立できた。また CRF01_AE で NFV 投与歴のある臨床検体由来のプロテアーゼ領域をクローニングし活性型で大腸菌に発現させる事に成功した。この臨床検体を NFV 投与前の野生型 (L10L/N88N) 及び治療開始後 (L10L/N88S および L10F/N88S) と経時的にクローニングし精製を開始した。これらのプロテアーゼの結晶構造解析から、プロテアーゼインヒビター (PI) がプロテアーゼ構造に与える影響及び薬剤耐性変異の相互関係がプロテアーゼ構造に与える影響の解析を行い、臨床検体由来のプ

ロテアーゼ結晶構造解析により臨床経過と耐性変異誘導によるプロテアーゼ構造変化の関連についても解析する。

F. 研究危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1)論文発表

Yan H, Mizutani TC, Nomura N, Takakura T, Kitamura Y, Miura H, Nishizawa M, Tatsumi M, Yamamoto N, Sugiura W. A novel small

molecular weight compound with a carbazole structure that demonstrates potent human immunodeficiency virus type-1 integrase inhibitory activity. Antivir Chem Chemother. 16:363-73, 2005

2)学会発表

なし

3) 特許の出願

なし

図 1

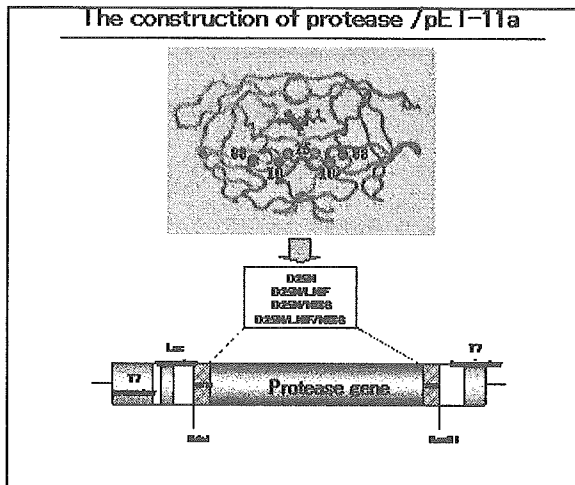


図 3

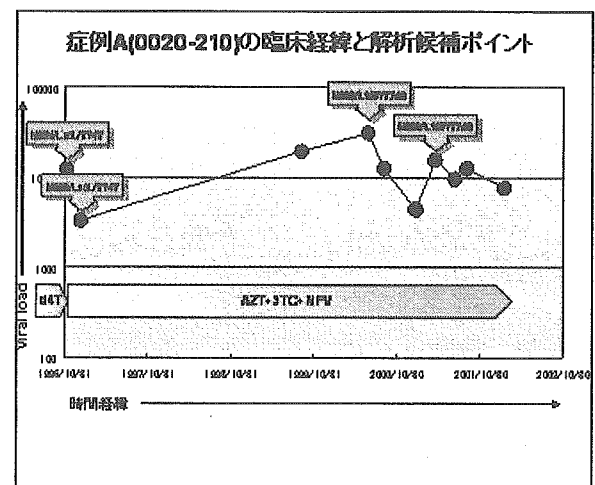
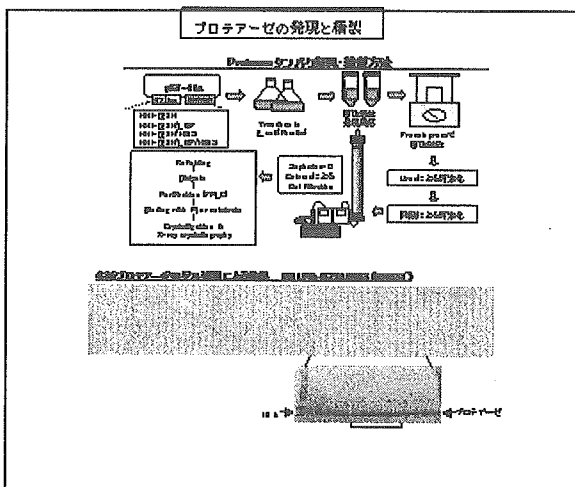


図 2



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

分担研究者：岡本 尚 (名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学)

研究要旨：HIV 複製を転写レベルで制御している NF- κ B は特に感染者体内で潜伏感染している HIV プロウイルスからのウイルスの発現に重要な役割を演じている。そこで HIV 潜伏感染細胞株 OM10.1 から NF- κ B 刺激因子である TNF によってウイルス増殖の誘導をかけ、新たに開発された IKK 阻害剤 ACHP(2-amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-piperidin-4-yl nicotinonitrile)を用いてウイルス複製に対する阻害効果を検定した。その結果、50%細胞毒性濃度(CC50)が 15 μ M であるのに対して、50%ウイルス抑制濃度(EC50)が 0.56 μ M と、効率よくウイルス複製の阻害効果が起こることを確認した。このことは、ACHP もしくはその誘導体は、HIV 感染者体内で潜伏感染している HIV に対する治療上の有効性を示唆した。

A. 研究目的

T HIV 感染者ではウイルスは樹状突起細胞やマクロファージ、および静止期 CD4 陽性 T 細胞などに潜伏感染している。HAART 療法などで血液中の HIV 負荷量が検出限界以下になってもこれらの細胞に HIV が潜伏感染している限り、HAART 中断に伴うウイルス増殖の再開や薬剤耐性ウイルスの出現は不可避である。また、HIV 増殖の律速段階は転写の過程であり、この段階を抑えることにより HIV 複製を効率よく抑えることは、HIV 感染者からの AIDS 発症を食い止めるための重要な治療標的と考えられている。HIV 感染細胞でのウイルス遺伝子発現は NF- κ B に依存しているが、そのシグナル伝達は I κ B kinase α (IKK α)および IKK β を介することがわかっている。IKK β は NF- κ B 阻害因子 I κ B のリン酸化を起こすことによってその分解と共に NF- κ B の活性化を引き起こす(「古典的経路」)。それに対して、IKK α は NF- κ B を構成する p65 サブユニットのリン酸化と p100/p52 サブユニットのリン酸化と processing に関わる(「非古典的経路」)。HIV 潜伏感染細胞ではこのいずれもが関与している。そこで、我々は新たに開発された IKK 阻害剤 ACHP (2-amino-6-[2-(cyclopropyl-methoxy)-6-hydroxy-phenyl]-4-piperidin-4-yl nicotinonitrile)のウイルス複製に対する阻害効果を

検定した。また、HIV 潜伏感染細胞での NF- κ B 活性化機構における IKK α と IKK β の役割についても検討した。

(倫理面への配慮)

本研究には該当せず。

B. 方法

1. 試薬と抗体：IKK 阻害剤 ACHP はバイエル薬品の Murata ら(Bioorg. Med. Chem. Lett. **13**:913-918, 2003; Bioorg. Med. Chem. Lett. **14**:4019-4022, 2004)より供与された。その化学構造を Fig. 1A に示す。I κ B α とリン酸化型 I κ B α (Santa Cruz 社)、p65 とリン酸化型 p65 (Ser536)(Cell Signaling Technology 社)、 β -actin (Santa Cruz 社)に対する抗体はそれぞれ市販のものを用いた。また、HIV 蛋白に対する抗体としては HIV 感染者のプール血清を用いた。
2. 細胞株とウイルス産生の定量：HIV 潜伏感染ヒトマクロファージ細胞株 OM10.1 は再感染を防ぐために 20 μ M の AZT 存在下で培養した。培養細胞上清への HIV 産生量の定量は、HIV-1 p24 antigen ELISA kit (Cellular Products 社)を用いた。薬剤の細胞毒性は WST-1 法によって検定した。
3. ウェスタンブロット：細胞抽出液を 10% SDS-PAGE で展開後、PVDF 膜に転写し、定法に基づいて一次抗体および 2 次抗体を反応させ、SuperSignal (Pierce 社)を用いて蛍

光発色によって蛋白バンドを検出した。

4. クロマチン免疫沈降法：種々の処理を行った OM10.1 細胞培養に最終濃度 1%となるようにフォルムアルデヒドを加え、SDS-lysis buffer で細胞を処理後、超音波処理によってクロマチンを破碎し、p65(NF- κ B)抗体を室温で 2 時間および 4°C で 1 時間反応させた。その後、protein G ビーズを加えて免疫沈降を行い、フォルムアルデヒドによる架橋反応を 65°C 6 時間の熱処理によって逆転させ、DNA を Qiagen spin column を用いて精製後、NF- κ B 結合領域を含む HIV LTR 部分の DNA(-176 to +61)を PCR で増幅し、NF- κ B が結合している HIV DNA を検出した。

C. 結果

(1) ACHP は TNF による I κ B α のリン酸化と分解及び p65 のリン酸化を抑制した。

OM10.1 細胞を TNF 刺激し、I κ B α のリン酸化とその分解および p65 の Ser536 リン酸化をウェスタンブロット法で経時的に観察した (Fig. 1B)。I κ B α と p65 のリン酸化は刺激 1 分後より観察され、I κ B α の分解がその後続いた。ACHP を 1 もしくは 10 μ M 加えることにより、これらの変化は ACHP の量依存性に抑制された。

さらに、TNF および ACHP による HIV-1 LTR からの遺伝子発現を luciferase assay によって調べた (Fig. 1C)。TNF によって 3 倍以上に増加した遺伝子発現は ACHP によって量依存性に抑制されたが、NF- κ B 結合部位に変異を加えたレポーター遺伝子 (CD12mt) では何の変化も見られなかった。このことから、ACHP は HIV-1 の転写を NF- κ B 依存性に抑制することが示された。なお、ここには示さないが、ACHP によって TNF 刺激に伴う NF- κ B の核への移行も阻止された。

(2) TNF による HIV 潜伏感染細胞 OM10.1 からのウイルス複製は ACHP により抑制される。

OM10.1 を TNF で刺激すると、培養上清への HIV 産生が著明に誘導され、この量は加えた TNF 濃度に比例した (Fig. 2A)。しかしながら、あらかじめ ACHP を加えておくと、HIV 産生量は ACHP 濃度に依存して著

しく減少した。50%抑制を示す ACHP の濃度 (EC50) は TNF 濃度によらず、およそ 0.5 μ M であった。ここでは刺激後 24 時間の培養上清中ウイルス濃度を示しているが、培養時間を長くしても抑制は継続的に起こっていた (Fig. 2B)。また、細胞内でのウイルス蛋白合成も著明に抑制された (Fig. 2C)。ACHP の細胞毒性を調べた結果を Fig. 2D に示すが、50%細胞障害を起こす濃度 (CC50) は 15 μ M であり、therapeutic window はおよそ 30 に達した。

(3) ACHP は NF- κ B の HIV-1 LTR DNA への結合を抑制する。

ACHP による NF- κ B の HIV-1 LTR DNA への結合阻害効果を検討するためにクロマチン免疫沈降法を行った。Fig. 2 の実験と同様に、あらかじめ OM10.1 細胞を種々の濃度の ACHP で前処理し、TNF で刺激し、その後 1 分から 60 分間に細胞を回収し、フォルムアルデヒドによるクロスリンクと超音波処理を行った後、抗 p65 抗体で免疫沈降を行った。さらに免疫沈降物中の DNA を精製し、HIV-1 LTR DNA の量を PCR にて判定量的に検出した。Fig. 3 はその結果を示したものである。TNF 刺激により NF- κ B は 1 分後から HIV-1 LTR および同様に NF- κ B 結合領域を持つ I κ B α のプロモーター DNA に結合し、この効果は刺激から 5-10 分後に最大になった (Fig. 3A)。

次に、この変化に対する ACHP の効果を見た結果が Fig. 3B である。TNF 刺激による NF- κ B の HIV や I κ B α のプロモーター DNA への結合は、ACHP の濃度依存性に抑制された。

D. 考察

新たに開発された IKK 阻害薬は in vitro リン酸化酵素検定での IC50 値は、IKK α および IKK β に対してそれぞれ 8.5 nM と 250nM であったが、他のキナーゼに対する抑制作用は 20 μ M でも見られず、IKK に対する選択的な阻害作用を示した。今回の研究においても潜伏感染細胞からの HIV 複製阻止効果と細胞毒性との間には ACHP 濃度でおよそ 30 倍の開きがあり、特異性の高さが注目された。

細胞内に潜伏感染する HIV に対してどの

ように対処するべきかについては、二つの相異なる考え方が存在する。第一の立場は、潜伏している HIV からの転写を抑制することによって HAART によって検出限界以下となった HIV 感染者でのウイルス複製の再活性化を抑制し続け、潜伏感染細胞が寿命の限界に達するのを待って HIV 感染者からのウイルス廃絶を諮るものであり、我々の戦略もその立場に立っている。他方、潜伏感染細胞での HIV 複製を HDAC 阻害剤などで強引に誘導し、その後直ちに HAART 療法を行って感染細胞を根絶しようとする試みを行っている研究者もいる。しかしながら、後者の方法では HAART の十分に到達しない脳などの組織では感染細胞の根絶は期待できず、いたずらに HIV 複製による臓器単位でのウイルス感染症の進行を促進するおそれが多分にある。今後、実際に生体に投与できる NF- κ B 阻害剤が開発されれば、この点が明らかにされるであろう。

E. 結論

IKK 阻害剤 ACHP は HIV 潜伏感染細胞モデルでその治療的有効性があることが明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tozawa, K., Okamoto, T., Kawai, N., Hashimoto, Y., Nagata, D., Hayashi, Y., and Kohri, K.: Positive correlation between sialyl Lewis X expression and pathological findings in renal cell carcinoma. *Kidney Int.* 67:1391-1396, 2005
- 2) 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.* 11:1974-1982, 2005

- 3) 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* 10:253-260, 2005
- 4) Ota, S., Kanazawa, S., Kobayashi M., Otsuka T. and Okamoto, T.: establishment of a simple and quantitative immunospot assay for detecting anti-type II collagen antibody using infrared fluorescence imaging system (IFIS). *J. Immunol. Methods* 299:189-198, 2005
- 5) Takahashi, N., Kobayashi, S., Kajino, S., Imai, K., Tomodo, K., Shimizu, S., and Okamoto, T.: Inhibition of the 53BP2S-mediated apoptosis by nuclear factor κ B and Bcl-2 family proteins. *Genes Cells.* 10:803-811, 2005.
- 6) Imai, K., Nakata, K., Kawai, K., Hamano, T., Mei, N., Kasai, H. and Okamoto, T. :Induction of OGG 1 gene expression by HIV-1 Tat. *J. Biol.Chem.* 280:26701-26713, 2005.
- 7) Tanaka, K., Hasegawa, J., Asamitsu, K. and Okamoto, T. :Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor κ B inhibitor parthenolide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280:26701-26713, 2005
- 8) 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. 15:79-86, 2005

9) Okamoto, T., Sanda, T., and Asamitsu, K.,: NF- κ B signaling and carcinogenesis. Curr. Pharm. Design, 2006 (in press).

10) Katagiri, D., Hayashi, H., Victoriano, Ann Florence B., Okamoto, T., Onozaki, K.,: Estrogen stimulates transcription of human immunodeficiency virus type 1(HIV-1),Int. Immunopharm.6:170-181, 2006 (in press).

11) Sanda, T., Asamitsu, K., Ogura, H., Iida, S., Utsunomiya, A., Ueda, R., and Okamoto, T., :Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I κ B kinase inhibitor. Cell,2006 (in press)

12) Victoriano, A. F. B, Asamitsu, K., Hibi, Y., Imai, K., Barzaga, N.G., and Okamoto, T.: Inhibition of Human

Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication in Latently Infected Cells by a Novel IKK Inhibitor. Antimicrob. Agents. Chemother. 2006 (in press)

13) Victoriano, A.F.B., Asamitsu, K., Hibi, Y., Imai, K., Barzaga, N.G., and Okamoto, T.: Inhibition of HIV-1 replication in latently infected cells by a novel I κ B kinase inhibitor. Antimicrob. Agents Chemother.2006(in press)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願中)

IKK 阻害剤

特許出願日 平成17年10月5日

出願番号 特願 2005-292660