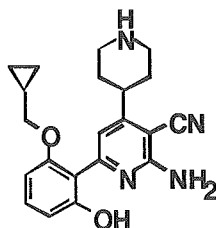
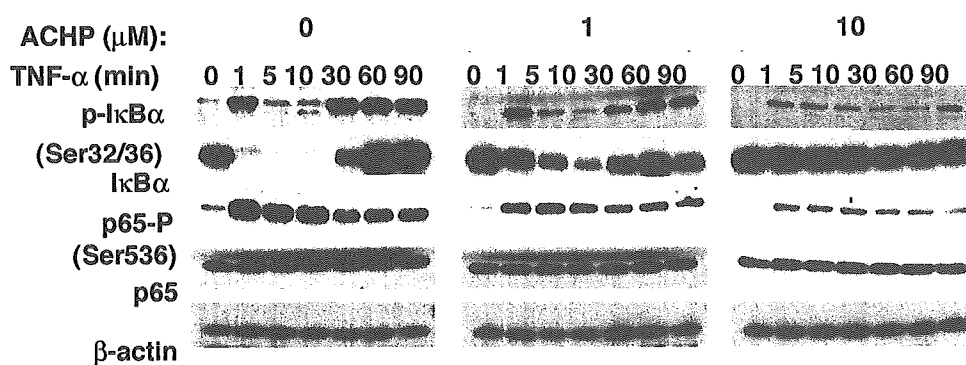


A

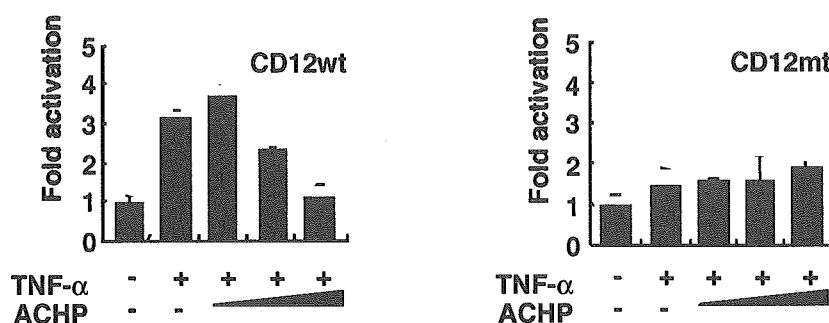


2-amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-piperidin-4-ylnicotinonitrile (ACHP)

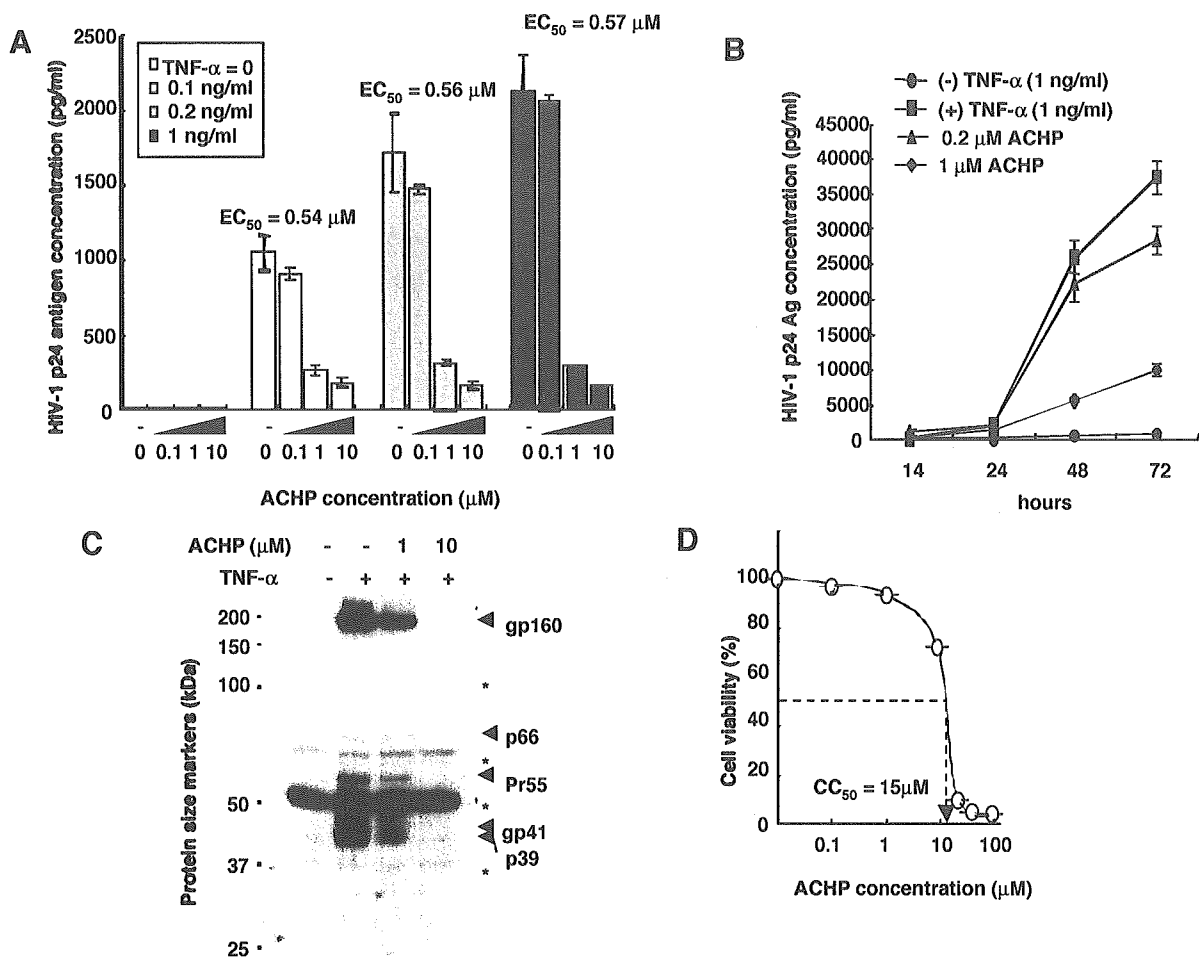
B



C

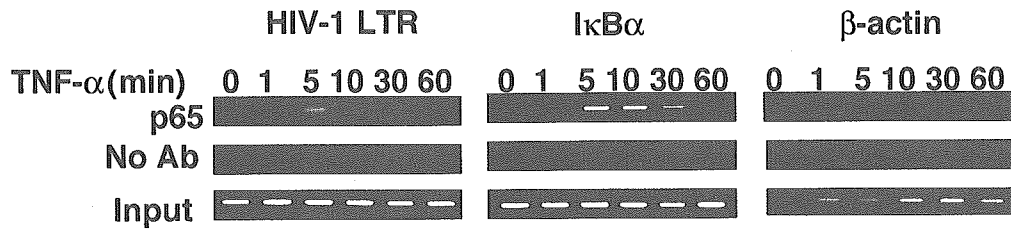


**Fig.1. Effect of ACHP on the IκBα phosphorylation, degradation and p65 phosphorylation induced by TNF-α.** (A) Chemical structure of ACHP. (B) Inhibition of IκBα phosphorylation, degradation and p65 phosphorylation by ACHP. OM10.1 cells ( $1 \times 10^6$  cells/ml) were pretreated with or without ACHP for an hour, then stimulated with TNF-α (1 ng/ml) for the indicated time periods. Whole cell extracts were fractionated on 10% SDS-PAGE and subjected to immunoblot analysis with the specified antibodies. Immunoblotting of β-actin indicates that the equal amounts of protein were applied each lane. (C) Effects of ACHP on the NF-κB-dependent HIV gene expression. Transient luciferase assays were performed with reporter plasmids containing the wild type (CD12 wt) and mutant NF-κB sites. TNF stimulation was carried out as in Fig. 1B.

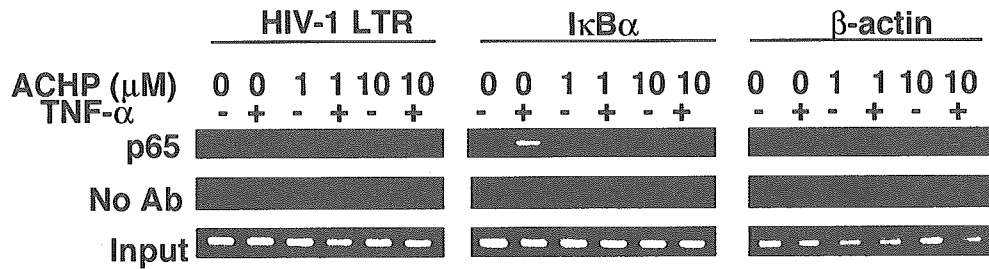


**Fig. 2. Effect of ACHP on the TNF- $\alpha$ -induced HIV-1 production in latently infected cells.** (A) OM10.1 cells ( $2 \times 10^5$  cells/ml) were pretreated with or without ACHP for an hour, then stimulated with TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) for 24 hrs. Cell supernatants were then collected and analyzed for HIV-1 p24 antigen levels using a commercial ELISA kit. (B) Time course of the effects of ACHP in inhibiting HIV production from OM10.1 after TNF stimulation. (C) Whole cell extracts were prepared and immunoblotted with human HIV-1 infected serum for the analysis of HIV-1 viral proteins (whole cell extracts). The locations of each viral product are indicated by arrows. \*, unspecific bands. (D) Cytotoxicity of ACHP on OM10.1 cells. Cell viability was determined by the WST-1 method and the 50% cytotoxic concentration,  $CC_{50}$  value, was extrapolated from this measurement.

**A**



**B**



**Fig. 3. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays for NF- $\kappa$ B (p65) binding to promoters.** (A) Kinetics of TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B binding to the HIV-1 LTR. (B) ACHP-mediated inhibition of TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B binding to the HIV-1 LTR. OM10.1 cells ( $1 \times 10^5$  cells/ml) were treated with TNF- $\alpha$  (1 ng/ml) for the indicated time periods, and ChIP assays were performed with anti-p65 antibody or no antibody (negative control). The detection of the immunoprecipitated DNAs in the HIV-1 LTR (first column), I $\kappa$ B $\alpha$  (second column) or  $\beta$ -actin promoters (third column) was analyzed by PCR with promoter-specific primers. Input DNA represents total input chromatin (1%).

# 1. HIV-1 細胞侵入制御；脂質二重膜流動性制御因子の探求

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 教授

**研究要旨** HIV-1 エンベロープと細胞膜との fusion pore 形成がウイルス侵入に必要であり、この成立に細胞膜とウイルスエンベロープの流動性が関与していると報告した。このことから、膜流動性を抑制することによる感染阻止の方策を追求した。グリチルリチン(GL)はコレステロール様の構造を持つ水溶性の物質である。GL は HIV-1 だけでなくインフルエンザ A ウイルスや VSV-G pseudovirus などの感染を 0.2 ~ 0.7mg/ml の持続処理で抑制した。また、HIV-1 や HTLV-I で誘導される細胞融合も持続処理で阻止した。しかし、1mg/ml GL で細胞をあらかじめ処理し、GL free の培地で感染実験や細胞融合実験を行うと、逆に感染価や細胞融合現象の亢進が見られた。同じ条件下で GL の細胞膜流動性への作用を調べると、1mg/ml GL の持続処理では流動性の抑制、前処置では膜流動性が次第に亢進することが認められた。膜流動性とウイルス感染価には密接な関連があり、これはエンベロープを有するウイルスにとって fusion pore の形成が細胞内への侵入に必須であることを示していると思われた。

## A. 研究目的

HIV-1 の感染と侵入には脂質二重膜の流動性を利用した multiple-site binding が fusion pore の形成に必要である。温度などの様々な膜流動性に変化を与える因子を作用させ HIV-1 の感染性と膜流動性との関連を調べた。その結果、5%の流動性の減少は 56%の感染抑制、5%の流動性亢進は 2.4 倍の感染増強をもたらすことがわかった。そこで、この流動性を制御することで HIV-1 の感染を阻止する物質の解析を試みた。

脂質二重膜の流動性をコントロールしている物質の一つにコレステロールがある。膜におけるコレステロールの含量が高いと、その流動性は低下する。また、fusion pore の形成は、ほとんどのエンベロープを有するウイルスの侵入に必要である。従って、コレステロール様の構造を持ち、これまで広範囲のウイルスに抑制的に作用すると報

告されているグリチルリチンに焦点を当て、その抗ウイルス作用の解明を試みた。

## B. 研究方法

1. 細胞とウイルス：GHOST/CXCR4 細胞、MT-2 細胞、および HIV-1 の持続感染細胞である MOLT-4/C-2 細胞を使用した。ウイルスはルシフェラーゼ遺伝子を有し NL43 の env(X4)で pseudotyping した NL43-luc ウイルスを用いた。

2. 感染価の測定：GHOST/CXCR4 細胞と NL43-luc ウイルスを使用し、感染後 2 日目にルシフェラーゼ活性を測定した。インフルエンザ A ウイルスは MDCK 細胞を用い赤血球吸着反応で、ポリオウイルスは FL 細胞を使用し TCID50 で感染価を測定した。

3. ウイルス吸着量の測定：細胞に吸着した HIV-1 の定量は p24 抗原を ELISA 法で測定することで行った。その他、Western

blotting、混合培養による cell-cell fusion 測定など行った。

4. 試薬：ステロール環（疎水性）と糖（親水性）とが結合したグリチルリチン(GL)を膜流動性制御因子として用いた。

5. 細胞膜流動性の測定：5-doxy stearic acid と細胞を室温で 20 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄した。その後、細胞膜に取り込まれた 5-doxy stearic acid の動きを電子スピンラベル(ESR)法で解析した。細胞膜の流動性は ESR の波形により order parameter (S) として算出した。

$$S = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / 27.3 G$$

(倫理面での配慮はこの研究では必要ない)

### C. 研究結果

#### 1. 細胞膜流動性への GL の作用：

まず GL が細胞膜とエンベロップの流動性に作用するか調べた。1 mg/ml の GL は MT-4 や MT-2 細胞の膜流動性を 4 から 5% 抑えた (図 1E)。また、HIV-1 エンベロップの流動性も抑制した (図 1F)。GL は明らかに脂質二重膜の流動性抑制因子である。

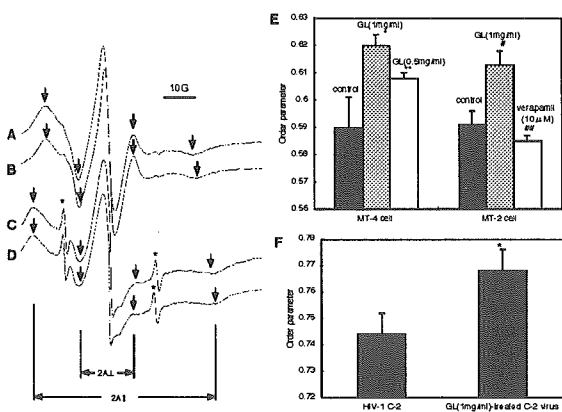


図 1 GL の細胞膜とウイルスエンベロップ流動性への作用。A:MT-2; B:1mg/ml GL 処理 MT-2; C:HIV-1 C-2; D:1mg/ml GL 処理 HIV-1 C-2; E:GL の細胞膜流動性への作用; F:GL の HIV-1 エンベロップへの作用。

#### 2. GL のウイルス感染性への作用：

GL の HIV-1 に対する作用は、0.2 mg/ml で 50%の感染を抑制し、X4 も R5 HIV-1 も同様に作用した。HIV-1 粒子に直接作用させると、ウイルスの感染価が低下した。しかし、感染標的細胞を前処理すると効果はなく、1 mg/ml ではむしろ感染の増強が認められた。GL はインフルエンザ A ウイルス (図 2A)、VSV-G pseudovirus (図 2B) にも抗ウイルス作用を示したが、ポリオウイルスには作用しなかった (図 2C)。

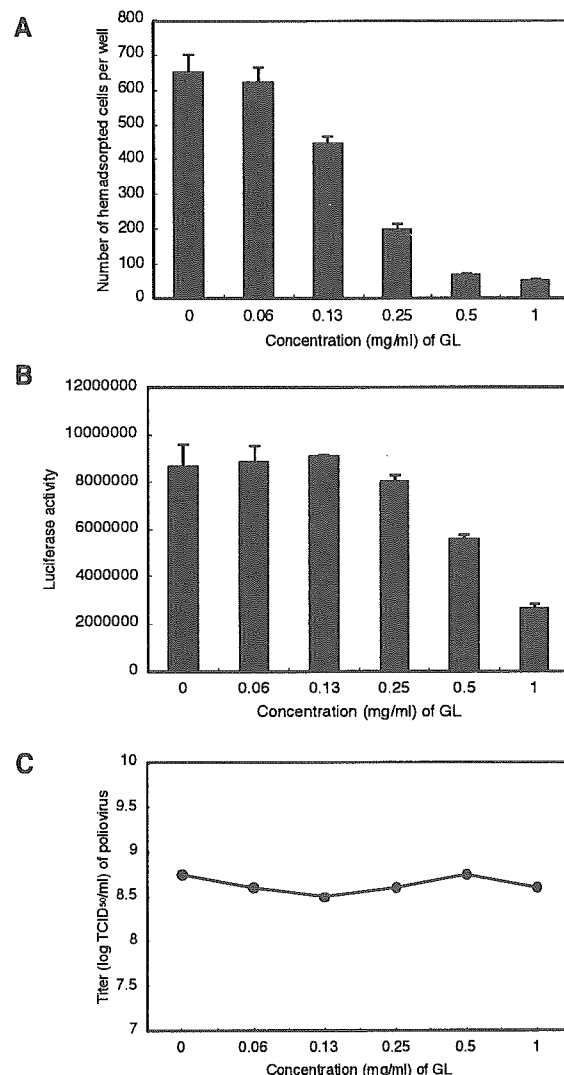


図 2 GL のインフルエンザ A ウイルス(A)、VSV-G pseudovirus(B)、ポリオウイルス(C)への作用。

#### 3. GL の細胞融合への作用：

細胞の混合培養による GL の細胞融合抑制

は HIV-1 と HTLV-I の両方で認められた。しかし、混合する細胞を 1 mg/ml の GL であらかじめ処理すると、融合細胞の増加が見られた。

#### 4. GL の細胞膜流動性への経時的作用：

膜の流動性は、MT-4 細胞を 1 mg/ml の GL で持続的に作用させると、5-DSA 作用後 20 分まで抑制されたままであった。しかし、GL 作用後洗浄し、ESR を GL-free の培地で行うと膜流動性は急激に亢進した。この、流動性の変化は、HIV-1 の感染性と細胞融合の抑制と促進を良く説明するものであった。

#### D. 考察

GL は持続作用させると、HIV-1 の感染を R5、X4 共に阻止した。また、インフルエンザ A ウイルスや VSV にも抑制的に作用することから、広範囲に抗ウイルス作用を示すものと思われた。また、GL はウイルス粒子に直接作用し感染性を低下させ、混合培養による細胞融合現象も阻止した。しかし、細胞を前処理すると、ウイルスの感染価も細胞融合効率も増強される。同じ条件下で、細胞膜の流動性を経時的に測定すると、持続的 GL 処理では膜流動性は持続的に抑えられ、GL の前処理では細胞膜の流動性は急激に亢進した。この流動性の変化は、感染性と細胞融合能の変化と一致していた。

GL の抗ウイルス作用には 0.5 mg/ml と高い濃度が要求される。この事は GL の臨床応用には大きな問題である。しかし、GL のように脂質二重膜に自由に入出力し、その結果その流動性を調節する因子は、広範囲な抗ウイルス剤として開発が可能であると考えられた。

#### E. 結論

GL は持続的に作用させると、主にエンベロープを有するウイルスに対し感染阻止

として作用する。また、ウイルス粒子に直接作用しその感染性を低下させる。細胞の混合培養で見られる細胞融合現象も、GL の持続作用で阻止される。しかし、細胞を 1 mg/ml の GL で前処理し、感染標的細胞として用いると HIV-1 の感染は亢進した。混合培養による細胞融合もその融合細胞数が増加した。GL の持続的作用では MT-2 細胞の膜流動性は持続的に抑制され、前処理ではその流動性は急激に亢進した。この GL 処理法の差による GL の流動性修飾作用のスイッチ on - off は、感染価の増強・抑制と相関していた。従って、脂質二重膜の流動性は、恐らく fusion pore の形成と関連し、ウイルス感染の成立に重要である。今後、膜流動性を抑えることによる広範囲抗ウイルス剤の開発を試みる。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Harada, S., Yusa, K., Monde, K., Akaike, T., and Maeda, Y. Influence of membrane fluidity on human immunodeficiency virus type 1 entry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329: 480-486, 2005.
- 2) Ng'walali, P.M., Kibayashi, K., Mbonde, M.P., Harada, S., Mwakagile, D., Kitinya, J.N., and Tsunenari, S. Neuropathology of human immunodeficiency virus infection: A forensic autopsy study in Dar Es Salaam, Tanzania. *Forensic Sci. Int.* 151: 133-138, 2005.
- 3) Yusa, K., Maeda, Y., Fujioka, A., Monde, K. and Harada, S. Isolation of TAK-779-resistant HIV-1 from an R5 HIV-1 gp120 V3 loop library. *J. Biol. Chem.* 280: 30083-30090, 2005.

4) Harada, S. Broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem. J.* 392: 191-199, 2005.

2. 学会発表

1) Harada, S. Correlation of HIV-1 infection and membrane fluidity. 2005 Keystone Symposia HIV Pathogenesis / HIV Vaccines: Current Challenges and Future Prospects (X7/X8). April 9-15, 2005, Banff, Alberta, Canada.

2) 原田信志、門出和精、前田洋助、遊佐敬介；膜流動性を修飾するグリチルリチンの抗ウイルス作用機序の解析、第 53 回日本ウイルス学会総会、2005 年 11 月、横浜。

3) 門出和精、遊佐敬介、前田洋助、原田信

志；CCR5 高発現細胞で複製が抑制される HIV-1 の性質、第 53 回日本ウイルス学会総会、2005 年 11 月、横浜。

4) 遊佐敬介、前田洋助、原田信志；shRNA 発現カセットを組み込んだ HIV-1 の性質、第 53 回日本ウイルス学会総会、2005 年 11 月、横浜。

5) 門出和精、遊佐敬介、前田洋助、原田信志；CCR5 高発現細胞で複製が抑制される HIV-1 の性質、第 19 回日本エイズ学会総会、2005 年 12 月、熊本。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし。

## 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

分担研究者：服部 俊夫 東北大学大学院医学系研究科感染症態学分野 教授  
研究協力者 肖鵬、宇佐美 修、庄敏

### 研究要旨

PCP 肺炎患者由来の HIV 株である SDA-1 ウイルスのエンベロープ遺伝子を用いて偽ウイルスを作成した。この系を用いてグリチルリチンがウイルスに作用して、多種類の補受容体 (CXCR4, CCR5, CCR3, CCR8) を用いた感染を抑制することを示した。また細胞側の CCR5 には直接結合して、SDA-1 の V3 ループと CCR5 が結合する過程を阻止する可能性も示唆された。これらよりグリチルリチンの抗ウイルス作用は多様な機構によることが明らかになった。

### A. 研究目的

HIV-1 は常に変異している。故にウイルス株の基本的な性質が変化している可能性もある。感染した個体レベルでも強い炎症反応があれば、HIV の通常の感染ルートを抑制するようなケモカインが多量に産生され、HIV も対応を余儀なくされると思われる。エイズ患者では CD4 陽性細胞が減少するので、ウイルスはそれ以外の細胞にも感染することを模索するかもしれない。このようなウイルスの変異に対応するためには、新たなウイルスを分離し、その感染機序を明らかにすることが必要である。我々はこれまでに PCP 肺炎を合併したエイズ患者より新たな HIV 株である SDA-1 を分離することに成功した。今年度の目標として、SDA-1 の感染機序の解明を試みた。具体的には偽ウイルスを作成して、高感度での感染系と多様な補受容体保有細胞を用いて、エイズ患者に抗 HIV 効果の報告されているグリチルリチン(Hattori T,

et.al.: Antiviral Res. 11:255-61, 1989.)

の作用機構を解明した。

### B. 材料・方法

ウイルス分離：症例は 53 才男性。既往歴は 20 歳 胆石症、27 歳 交通事故。輸血歴・海外渡航歴はなく感染経路は不明である。平成 13 年 8 月頃から倦怠感と喘鳴を訴え、8 月 28 日近医受診、某院に入院。両肺野のスリガラス陰影の増強、血液ガス分析の悪化から PCP 肺炎を疑われ、抗 HIV 抗体陽性・CD4 数 1/μl でエイズと診断した。この患者末梢血よりウイルスを分離した。

偽ウイルス作成：SDA-1 ウイルスの Full length Env 遺伝子を Nested PCR で増幅した。クローニングをスムーズに進めるために 5' 側の EcoR I (5') と 3' 側の Xho I (3') を追加した。そのプライマー配列は以下の通りである。

Outer primers:



Forward primer:

5'- TAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGAAG -  
3'

Reverse primer:

5'- TTGCTACTTGTGATTGCTCCATGT - 3'

Inner primers:

Forward primer:

5'-GATCGAATTCTAGGCATCTCCTATGGCA  
GGAAGAAG - 3'

Reverse primer:

5'-AGCTCTCGAGGTCTCGAGATACTGCTC  
CCACCC - 3'

得られた Env 遺伝子を用いて pSM-SDA-1 のクローンを選択した。pNL43 - Luc - R - E - plasmid とともに 293T 細胞に共に導入することにより偽ウイルスを作成した。コントロールウイルスは HXB2(X4), ADA(R5), 89.6(X4R5)を用いた。標的細胞は、U87/CD4, U87/CD4/CXCR4, U87/CD4/CCR5(FDA ワイス博士由来) および NP-2/CD4, NP-2/CD4/CCR2, NP-2/CD4/CCR3, NP-2/CD4/CCR5, NP-2/CD4/CXCR4, NP-2/CD4/CXCR5, NP-2/CD4/CCR8, NP-2/CD4/APJ, NP-2/CD4/GPR1, NP-2/CD4/RDC1 (群馬大学星野教授、清水講師由来)を用いた。

### C. 研究結果

SDA-1 ウイルスの Env 遺伝子を単離し、偽ウイルス感染系を確立した。このウイルスは CCR5,CXCR4,CCR3,CCR8 などの多様な補受容体を使用することがルシフェラーゼを用いた系 (A) および感染性ウイルスを用

いて上清の p24 抗原を測定する系 (B) で明らかになった。

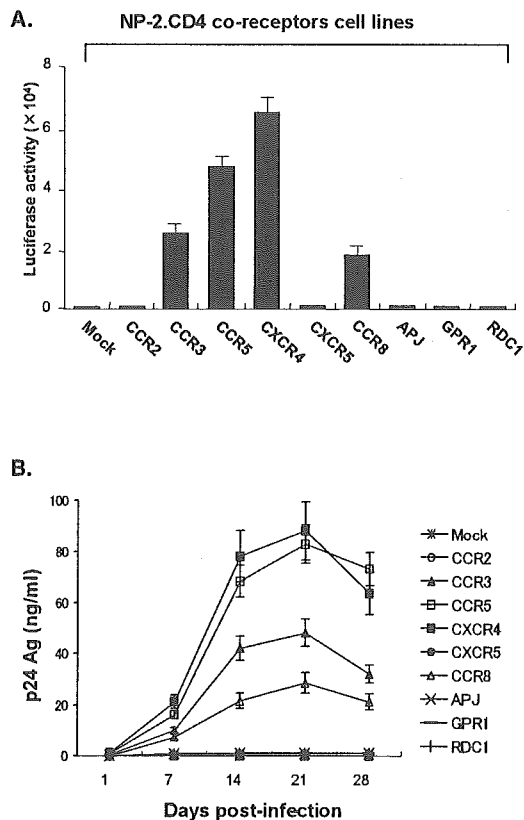


図 1 SDA-1 と結合する補助受容体 A.ルシフェラーゼ活性測定による結果 B.p24 の経時変化

この系でグリチルリチンとウイルスを 37 度一時間混合培養した後に、U87.CD4.CXCR4 あるいは CCR5 を標的にして、感染実験を行うと GL 濃度 300 $\mu$ M 濃度で SDA-1 感染をほぼ 100%阻止しえた。(図 2)

さらに NP2.CD4.CCR3 あるいは NP2CD4.CCR8 を標的にした際も同様な抑制効果が得られた。今度はグリチルリチンと種々の標的細胞を混合させた後に、細胞を洗浄し、SDA-1 偽ウイルスをチャレンジした。その結果では CCR5 を標的にした際にも抑制効果が得られた。これらの抑制効果はグリ

チルリチン製剤中に存在しているグリシン、システインでは見られなかったので、グリチルリチンによるものと思われる。(図 3)

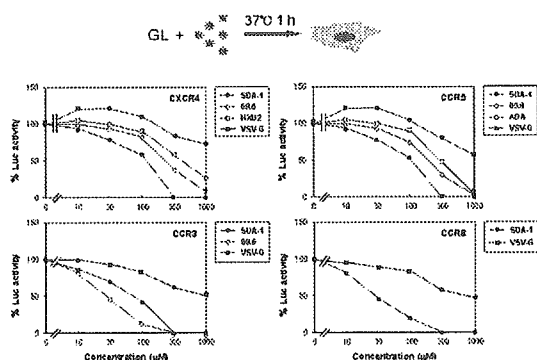


図 2.グリチルリチンによるウイルスへの作用。ウイルスにグリチルリチンを作用させた後に細胞に加えた。いずれの場合もルシフェラーゼ活性が低下した。

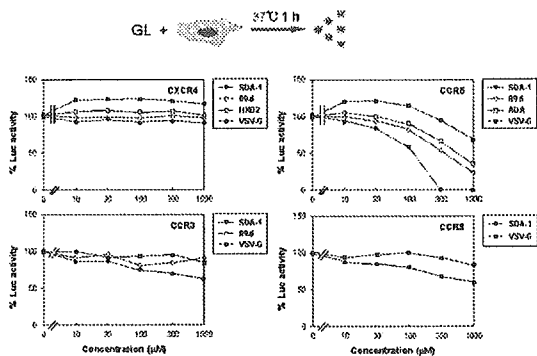


図 3. グリチルリチンによる細胞への作用。グリチルリチンを細胞に作用させた後にウイルスを加えた。CCR5 においてルシフェラーゼ活性が低下した。

さらに CCR5 を認識する各種のモノクロナル抗体の結合に及ぼす影響を観察した。すると 2D7 の結合を用量依存的に抑制したが 12G5 や合成 V3 ループの結合には影響を与えなかった。しかしながら 2D7 の結合を用量依存的に抑制することができた。

## D. 考察

### 本年度の成果

ここではグリチルリチンが多様な機構で抑制効果を発現することを明らかにした。また様々な補受容体を使用する SDA-1 を使用した高感度の感染実験系ができていたので、今まで検証できなかった CCR3, CCR8 を使用した感染標的細胞の検討も可能になった。ウイルスを前処理した際は広範囲のウイルスの感染を阻止することができた。

細胞をグリチルリチンで処理した後にウイルスのチャレンジをした系においては CCR5 特異的な感染が阻止された。またそのうち V3 ループのチップが結合する可能性の高い、第 2 番目の細胞外ドメインを認識する 2D7 抗体の結合を阻止することは極めて興味深い。即ちグリチルリチンは V3 ループが CCR5 に結合する過程を阻止することが推測された。

### 自己評価

本年度はグリチルリチンの CCR5 を標的とした感染阻止効果を明らかにすることができた。これは昨年度までに SDA-1 というウイルスを PCP 肺炎合併エイズ患者より分離できたことが大きく寄与している。本研究を遂行していくにあたっては、SDA-1 というウイルスを単離し、高感度な実験系が構築できたことが幸いした。CCR3, CCR8 を用いた感染系に対する抑制実験ができたことは極めて有意義である。さらに CCR5 を補受容体として使用する際には V3 ループのチップが第 2 番目の細胞外ドメインに結合することが大事とされているが、まさにグリチルリチ

ンはその領域に反応することを明らかにした。

#### 今後の展望

SDA-1 は CD4 細胞数が低くまた肺の炎症が極めて強い時期に分離されたウイルスであり、その時点での病態を明らかにしている。最近になりこのウイルスが、CD4 陰性の肝臓癌由来細胞にも感染することが明らかになった。これらの状況は本ウイルスの V3 ループの機能がより重要であることを示している。今後、この CD4 陰性の肝臓細胞を用いた感染実験を行い、V3 ループの新たな機能について検討を加えたい。

#### E. 結論

グリチルリチンが CCR5 の機能領域に反応することで SDA-1 感染を抑制することを明らかにした。

#### F. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

SDA-1 は AY902478 に登録した。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Ashino, J., Ashino, Y., Guio, H., Saitoh, H., Mizusawa, M. and Hattori, T. Low antibody response against tuberculous glycolipid (TBGL) in elderly gastrectomised tuberculosis patients. *Int. J. Tb. Lung Dis. Sep; 9(9):1052-3.2005.*
2. Usami O, Xiao P, Ling H, Liu Y, Nakasone T, Hattori T. Properties of anti-gp41 core structure antibodies, which compete with sera of HIV-1-infected patients. *Microb. Infect. Apr;7(4):650-7. 2005.*

3. Li, D., Gu, H. X., Zhang, S. Y., Zhong, Z. H., Zhuang, M. and Hattori, T. YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China. *Japanese J. Infect. Dis. in press. 2005.*
4. Zhou, H.Z., Li, Y., Ling, H., Liu, Y.C., Huang, B. C. and Hattori, T. Cloning and analysis of the envelope of HIV-1 CHNHLJ03009 from an infected individual in Heilongjiang province. *Chinese Microbiol. Immunol. in press.*
5. Usami, O., Xiao, P., Hong Ling, H. and Hattori, T. Competitive Study of Monoclonal Antibodies Against the HIV-1 Gp41 Core Structure. *Microbiol. Immunol. in press.*

##### 学会発表

グリチルリチンはCCR5あるいはenvelopeに作用してHIV-1 (SDA) の感染を抑制する。  
肖 鵬, 宇佐美修, 清水宣明, 星野洪郎, 服部俊夫. 日本ウイルス学会第53回学術大会. 2005年11月20-21日.横浜

### 3. 研究課題：HIV-1の細胞侵入過程の検討

分担研究者 小島 朝人 国立感染症研究所・感染病理部・室長

協力研究者 飛梅 実 国立感染症研究所・感染病理部・研究員

研究要旨：HIVはEnvとリセプターとの結合・膜融合・脱殻を経て感染するが、侵入の分子機構は未だ不明である。本研究ではこれまで、侵入素過程の*in vitro*無細胞解析系樹立及びFRETの技術を用いたvirus-cell fusion assay樹立を試み、良好な成績を得てきた。これらの系を用いた解析によりHIV-1のアクセサリ遺伝子産物Nefがウイルスの標的細胞への侵入過程に影響を与え、結果としてウイルスの感染性を増強させていることが示唆された。そこで本年度は、HIV(Nef+/-)のウイルス粒子、またNef存在、非存在下で作製したVSV-G, SFV-Envを持つシュードタイプHIV-1粒子を用いて、NefがHIV-1粒子の標的細胞へのどの侵入過程に影響を与えているかについて解析した。その結果、①吸着・膜融合過程にはNef+/-の差が認められず、②侵入過程をバイパスしたVSV-G/HIVの逆転写以降はNef+/-で同等であった。これらの事から、吸着/融合以降・逆転写前、即ち、脱殻過程に何らかの侵入拘束因子の介在が示唆された。また、Nefによるウイルスの感染性増強効果はHIV-1粒子特異的であり、HIV-1のGagおよびPolが必須であった。

#### A. 研究目的

HIV粒子の標的細胞への侵入はEnvと細胞膜リセプターとの結合から始まり、膜融合・脱殻を経て最終的に感染が成立する。この初期の侵入過程の解明は、新たなAIDS治療薬創生のための標的を提示する鍵を与えるものと考えられるが、現在得られている知見は乏しい。この点に関し飛梅らは、侵入過程に関与するウイルス因子としてNefの存在を示唆してきた。そこで本研究では、HIV-1のアクセサリ遺伝子産物Nefに焦点を当て、ウイルス粒子の標的細胞への侵入機序を明らかにすることを目標とする。

#### B. 研究方法

感染性シュードタイプウイルス粒子を作製するために感染性HIV-1 DNAクローンR8  $\Delta$ E(R8Env欠損株)、R8  $\Delta$ E  $\Delta$ N(R8Env及びNef欠損株)及びMuLV-GP(Moloney Murine Leukemia Virus Gag, Pol)を用いた。またこれらのプラスミド及びHIV-1 Env、MuLV-Env、VSV-G(Vesicular stomatitis virus G-protein)、RRV Env(Ross River virus

Env)、SFV Env(Semliki Forest virus Env)を293T細胞にリン酸カルシウム法を用いてコトランスフェクションし、48時間後の培養上清をウイルス液として用いた。培養上清中のp24量を測定し実験に用いた。感染価の評価には、標的細胞としてMAGIC5細胞及びMT4細胞を用い、ウイルス添加48時間後に感染価を評価した。エンドサイトーシスの経路を利用するEnvを持つウイルスの感染阻害剤としてエンドソーム内のpH低下を抑制するNH<sub>4</sub>Cl及びBafilomycineA1を用いた。

(倫理面への配慮) 該当事項無し。

#### C. 研究結果

1) Nef存在下で作製した(以下Nef+) HIV Envシュードタイプウイルスの感染価はNef非存在下で作製したウイルス(Nef-)の20倍程度強かった。また、HIV-1 Envと同様に細胞膜表面での膜融合を誘導するMuLV-EnvシュードタイプウイルスでもHIV-1 Envで見られたの同様にNef+ウイルスの感染価は優位にNef-ウイルスに比べ高かった。

2) MuLVをコアに持つHIV-1 Env及び

MuLV-Envシュードタイプウイルスの感染性にNefは影響を与えなかった。

これまでの報告同様にエンドサイトーシスの経路を利用しエンドソーム内の酸性条件下で膜融合が誘導されるVSV-Gシュードタイプウイルスの感染価では、Nefの存在の有無による差異は2倍程度であった。

一方、VSV-Gと同様に酸性条件下で膜融合が誘導されるRRV Env、SFV Envを持つNef+ シュードタイプウイルスの感染価はNef-ウイルスに比べ優位に高かった。エンドサイトーシスの経路を利用するVSV-G、RRV Env、SFV Envシュードタイプウイルスの感染性はエンドソーム内のpH低下を抑制するNH<sub>4</sub>Cl及びBafilomycineA1で完全に抑制された。HIV-Env及びMuLV-Envシュードタイプウイルスの感染価にNH<sub>4</sub>Cl及びBafilomycineA1は影響を与えなかった。

3) NH<sub>4</sub>Cl及びBafilomycineA1存在下で細胞培養液をpH5.5の培養液に置換し、強制的に細胞膜表面で膜融合を誘発した。VSV-GシュードタイプNef+ウイルスのNH<sub>4</sub>Cl存在下での感染性は薬剤を添加しない場合の50%に低下した。一方、Nef-ウイルスは薬剤を添加しない場合の感染性の90%を保持していた。BafilomycineA1添加群では、Nef+ウイルスは薬剤無処理に比べて30%に低下したものの、Nef-ウイルスでは66%の感染性を保持していた。HIV-1 Envシュードタイプウイルスの感染性は、酸性条件で影響を受けなかった。

#### D. 考察

HIV-1EnvやMuLV-Envを持つシュードタイプウイルスのウイルス感染性はウイルス粒子作成時にNefが存在しない場合非常に低い。一方、エンドサイトーシスの経路を利用し細胞内に進入し、エンドソーム内の酸性条件下で膜融合が誘導されるVSV-Gシュードタイプウイルスの感染性にはNefの存在、非存在による差異は2倍程

度であったが、VSV-Gと同様にエンドソーム内の酸性条件下で膜融合が誘導されるSFV、RRVのEnvを用いたシュードタイプウイルスの感染性はNef存在下で作成した場合、非存在下で作成したウイルスよりも優位に高く、Nefによるウイルス感染性増強作用は細胞膜上かエンドソーム内膜かという膜融合部位に規定されないことが示唆された。また、NH<sub>4</sub>ClまたはBafilomycine A1存在下で培養液を酸性条件に置換しVSV-Gシュードタイプウイルスの膜融合を強制的に細胞膜上で誘導した場合、Nef-ウイルスの感染価は薬剤無添加群の感染価と同程度を保持していたが、Nef+ウイルスの感染価は薬剤無添加群に比べ50%以上低下していた。これは、強制的に細胞膜上で膜融合を誘導することで、Nefによるウイルスの感染性増強作用機序を回避していると考えられる。

MuLVのコアを持つシュードタイプウイルスの感染性にNefは影響を与えないことから、Nefによるウイルス感染性増強効果はHIV-1 Gag特異的に発揮される。ウイルス粒子は、Gagを裏打ちとした細胞の脂質2重膜であり、ウイルス産生細胞での放出部位はウイルス側因子によっても規定される。先に述べた膜融合を強制的に細胞膜表面で誘導する系での感染実験ではNef+/-の差異が消失することから、ウイルス粒子の脂質二重膜により膜融合部位が規定されて脱核効率が左右されるような、新たな機序が存在している可能性も考えられる。

#### E. 結論

本年度の研究計画に沿って、Nef+・-のHIV-1と各種ウイルスエンベロープを用いて、異なる侵入経路（リセプターを介した特異的侵入経路と、エンドサイトーシスによる非特異的侵入経路）におけるNefの影響を検討した。その結果、Nefはウイルスの膜融合に影響を与えるのではなく、膜融合に続くGagコアの脱核過程に影響を与えている可能性が示唆された。

F.健康危険情報：該当事項無し。

G.研究発表

1.論文発表

Morikawa, S., Sakiyama, T., Hasegawa, H., Saijo, M., Maeda, A., Kurane, I., Maeno, G., Kimura, J., Hiramata, C., Yoshida, T., Asahi-Ozaki, Y., Sata, T., Kurata, T. and Kojima, A.: An attenuated LC16m8 smallpox vaccine: Analysis of full-genome sequence and induction of immune protection. *J. Virol.* 79, 11873-11891, 2005.

Kinomoto, M., Yokoyama, M., Sato, H., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Sata, T. and Tokunaga, K.: Amino acid 36 in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain controls fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J. Virol.* 79, 5996-6004, 2005.

H.知的財産権の出願・登録状況

該当事項無し。

## 4. HIV-1 感染における ERM ファミリー蛋白質の関与

分担研究者： 久保 嘉直 (長崎大学 熱帯医学研究所 エイズ感染防御分野)

**研究要旨：**細胞骨格に依存した感染受容体の集合が、HIV-1 による感染や細胞融合に関与していることが報告されている。しかし、感染受容体と細胞骨格が直接的に結合している証拠はなく、それらを橋渡しするリンカー蛋白質の存在が示唆されている。そこで我々は、膜蛋白質と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質として機能することが既に知られている ERM ファミリー蛋白質であるエズリン、ラジキシン、モエシンの HIV-1 感染における作用を解析している。今年度は、それぞれの遺伝子発現を RNAi によりノックダウンした細胞における HIV-1 ベクターの感染性を測定した。その結果、いずれの遺伝子発現をノックダウンした細胞においても 30-50%に感染力価が低下した。これらの結果は、ERM ファミリー蛋白質が HIV-1 感染に関与することを示している。

### A. 研究目的

HIV-1 感染において、細胞骨格に依存した感染受容体の集合が重要であることが報告されている。しかし、感染受容体と細胞骨格が直接結合している証拠はない。これらの結果から、HIV-1 感染に重要な感染受容体と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質の存在が考えられる。しかし、そのようなリンカー蛋白質は、まだ報告されていない。

そこで我々は、膜蛋白質と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質として働くことが既に知られている ERM ファミリー蛋白質であるエズリン、ラジキシン、モエシンの HIV-1 感染における関与を解析した。エズリンのドミナント・ネガティブ変異体が、HIV-1 ベクター感染を抑制することを前年度の本学会議において報告した。そこで、今年度は、RNAi を用い ERM ファミリー蛋白質をノックダウンすることにより、これら蛋白質の HIV-1 感染における関与を解析した。

### B. 研究方法

TE671/CD4 細胞に RNAi をトランスフェクションした。トランスフェクションして 24 時間後に、LacZ 遺伝子を持つ CXCR4-tropic HIV-1 ベクターを感染させた。感染 2 日後に X-Gal 染色することにより感染力価を測定した。コントロールとして VSV-G-pseudotyped HIV-1 ベクターを用いた。

RNAi により目的の蛋白質がノックダウンされたことを確認するため、エズリン、ラジキシン、モエシンを認識する抗体を用いウエスタンブロッティングを行った。コントロールとして、抗アクチン抗体によるウエスタンブロッティングを行った。

### C. 研究結果

エズリン RNAi をトランスフェクションした細胞において、HIV-1 ベクターの感染性は約 40%に低下した (Fig. 1)。VSV-G タグ抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、VSV-G タグ結合エズリンの発現は、RNAi により抑制されることが確認された。しかし、抗エズリン抗体を用い場合、発現抑制は観察されなかった。この抗エズリン抗体はラジキシンにも反応するためだと考えられる。

モエシン RNAi をトランスフェクションした細胞において、HIV-1 ベクターの感染性は約 30%に低下した (Fig. 2)。抗モエシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、モエシンの発現が抑制されることが確認された。

ラジキシン RNAi をトランスフェクションした細胞において、HIV-1 ベクターの感染性は約 50%に低下した (Fig. 3)。抗ラジキシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、有意なラジキシン発現の低下は観察されなかった。エズリンの場合と同様に、本研究において使用した抗ラジキ

シン抗体はエズリンにも反応するためと考えられる。

#### D. 考察

これらの結果は、TE671 細胞における HIV-1 感染において ERM ファミリー蛋白質が関与していることを示している。

RNAi トランスフェクションによる感染受容体発現に対する影響は、現在、解析中である。

3 種類の ERM ファミリー蛋白質を個別にノックダウンした場合、30-50%に感染性が低下した。1 種類をノックダウンした時、残り 2 種類の蛋白質が存在するので、それほど大きな効果が得られなかったのかもしれない。3 種類同時にノックダウンした場合の HIV-1 ベクター感染性に対する影響を解析中である。

また、本研究は CXCR4-tropic HIV-1 ベクターを用いた結果であるが、CCR5-tropic HIV-1 ベクターに対する影響も解析中である。

#### E. 結論

ERM ファミリー蛋白質であるエズリン、ラジキシン、モエシンはいずれも、HIV-1 感染に関与する。これらの蛋白質が HIV-1 感染に関与している報告は、まだない。エズリンが、HIV-1 感染症の新しい治療標的となりえる可能性を示唆する。

#### F. 健康危険情報

該当事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

- (1) 久保嘉直、吉居廣朗、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹：CXCR4 糖鎖修飾による CD4 非依存性 HIV-1 感染の抑制。第 4 2 回日本ウイルス学会九州支部総会、2005 年、那覇。
- (2) 吉居廣朗、大石和徳、天沼宏、山本直樹、久保嘉直：同種指向性マウスレトロウイルスの宿主域決定機構の解明。

第 4 2 回日本ウイルス学会九州支部総会、2005 年、那覇。

- (3) 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 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、2005 年、横浜
- (4) 吉居廣朗、大石和徳、山本直樹、久保嘉直：Mus dunnii 細胞株の同種指向性マウス白血病ウイルス感染低感受性の決定機構。第 5 3 回日本ウイルス学会学術集会、2005 年、横浜



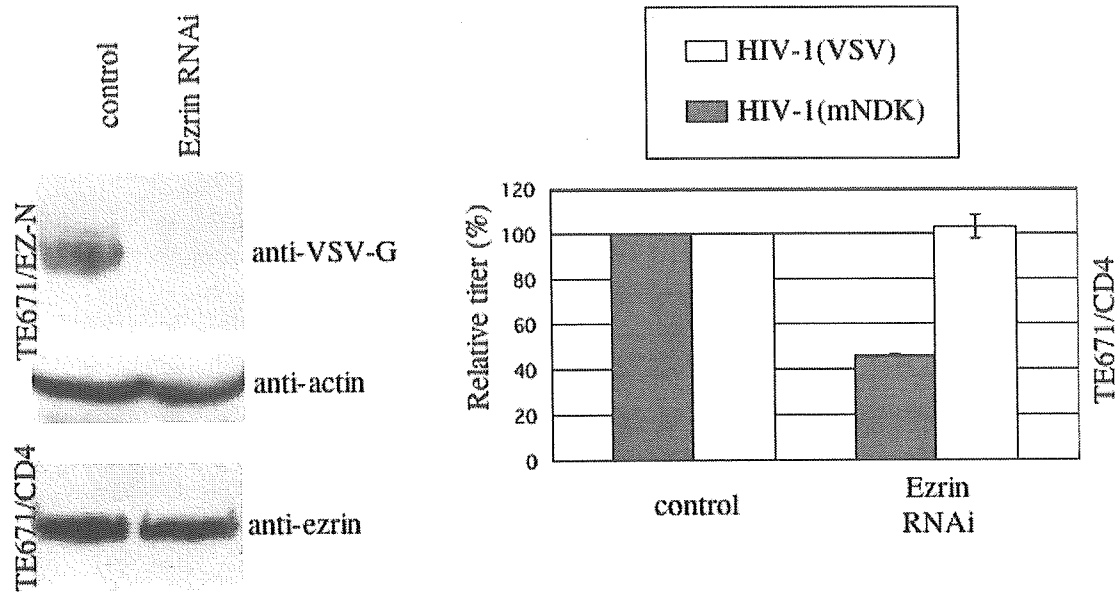


Fig. 1  
Ezrin RNAi inhibits HIV-1 vector transduction.

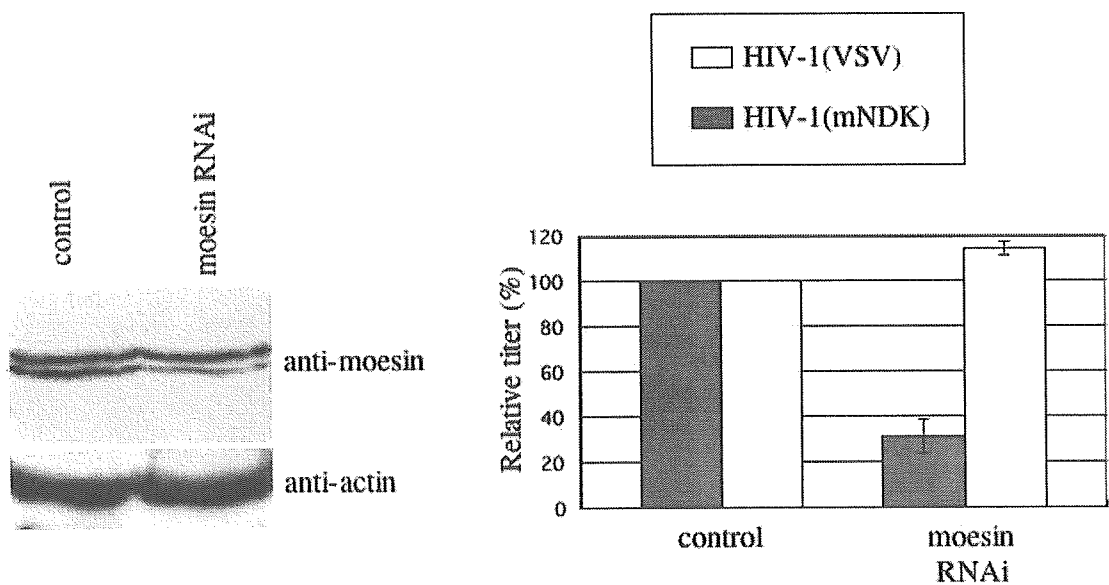


Fig. 2  
Moesin RNAi inhibits HIV-1 vector transduction.

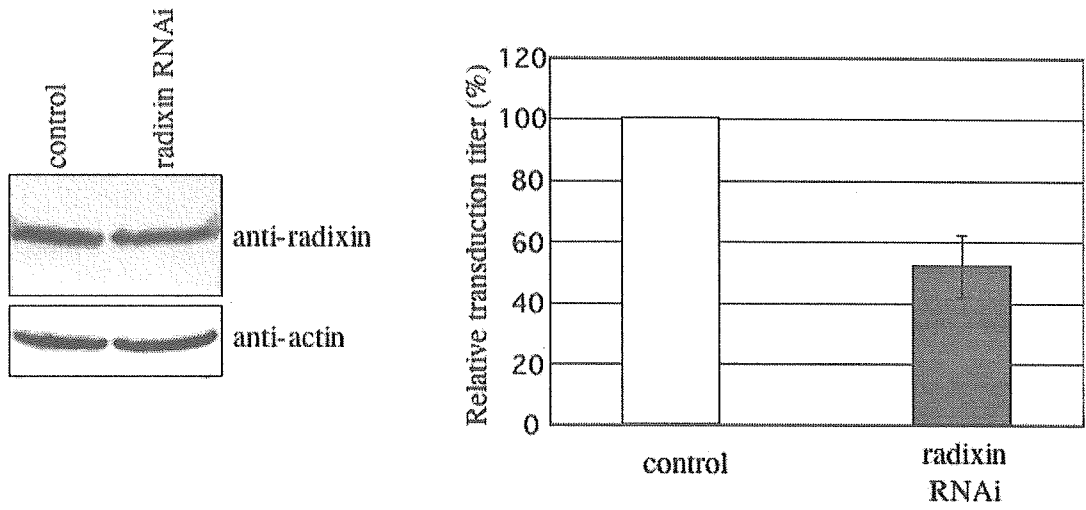


Fig. 3  
Radixin RNAi inhibits HIV-1 vector transduction.

## 5. HIV-1 複製初期過程制御:Vpr 結合因子の検索

間 陽子(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)

これまでに我々は、Vpr が Imp  $\alpha$  のみを介して核移行する新規核移行機序を有することを発見した。また、Imp  $\alpha$  との結合能が消失した Vpr 変異体は核移行能を失い、それを組み込んだウイルスは複製が阻害されることを報告した。以上の結果は、Vpr と Imp  $\alpha$  の結合が核移行とウイルス複製に必須であること、そして、その結合を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発の可能性を強く示唆している。そこで、Vpr と Imp  $\alpha$  との結合を阻害する低分子化合物の同定を試みた。まず、大量精製した GST と His tag 融合 Vpr および Imp  $\alpha$  を用いて、Vpr と Imp  $\alpha$  との結合を正確、簡便および高感度に検出するための ELISA 法を構築した。さらに、この系に Imp  $\alpha$  と結合する核輸送担体 Imp  $\beta$  を添加すると、Vpr と Imp  $\alpha$  の結合が競合的に阻害されたことから、構築した ELISA 法は、Vpr と Imp  $\alpha$  の結合阻害を正確に測定できる系であると判断した。この ELISA 法を用いて、2000 化合物からスクリーニングして、Vpr と Imp  $\alpha$  の結合を阻害する低分子化合物 47 種を選択した。その内 10 種の化合物が、GST pull down 法において Vpr と Imp  $\alpha$  の結合を阻害し、さらに 3 種類が、核移行解析において Vpr の核移行を阻害した。現在、感染実験を行っておりウイルス複製への影響を解析中である。

### 1. 研究目的

HIV-1 の特徴の一つが他のレトロウイルスとは異なりマクロファージなどの非分裂細胞に感染できる点である。それは、HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr が Pre-integration complex (PIC) を核内に移行させるためと考えられる。我々は以前に、Vpr が一般的に行われる核輸送担体 Imp  $\alpha/\beta$  による核移行とは異なった Imp  $\alpha$  のみによる新規核移行機序を有することを発見した。さらに、Vpr に存在する 3 つの  $\alpha$ -helix ドメインの内、 $\alpha$  H1 と Imp  $\alpha$  の結合こそが核移行に必須であること、その結合能を消失した Vpr 変異体を有するウイルスはマクロファージへの感染性が激減することを初めて示した。この事実は、Vpr と Imp  $\alpha$  との結合を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発の可能性を強く示唆している。

本研究の目的は、Vpr と Imp  $\alpha$  との結合がマクロファージへの HIV-1 感染に必須であるという申請者らの初めて見出した成果を根幹にし、Vpr と Imp  $\alpha$  との結合を阻害する低分子化合物を開発し、新たな抗 HIV-1 薬の創製を目指すものである。具体的には、X線構造解析情報に基づいた *in silico* 技術を駆使して、Vpr と Imp  $\alpha$  の結合を阻害する低分子化合物を設計、創製するために、大腸

菌発現系を用いて精製した Vpr と Imp  $\alpha$  複合体の結晶化と構造解析を行う。一方、実際に、複数の低分子化合物ライブラリーから Vpr と Imp  $\alpha$  の結合を阻害する低分子化合物をスクリーニングする。最終的な候補化合物の効果は、感染実験によるウイルス感染の阻害の有無で立証する。

### 2. 研究方法

#### 1) ELISA binding assay に使用する Vpr および Imp $\alpha$ の精製:

GST-Vpr (Vpr の核移行の最小機能ドメイン N17C74) に GST-GFP-His と GST-Imp  $\alpha$ -His の大腸菌発現プラスミド pGEX-6p3 に組み換え、大腸菌で各々の蛋白質を発現させ、GSH および Ni カラムを用いて精製した。

PreSission protease および Tev protease により消化後、GST-Vpr と Imp  $\alpha$ -His を回収した。これら精製蛋白質が、本来の機能と活性を維持していることを GST pull-down 法および、*in vitro* nuclear import assay により確認した。

#### 2) ELISA binding assay の構築と低分子化合物のスクリーニング:

GST-Vpr と Imp  $\alpha$ -His を用いて ELISA 法の構築を行った。96 穴プレートに抗-GST 抗体を固相化し、次に GST-Vpr を固着し、Imp  $\alpha$ -His を添加後に、HRP 標識抗-His 抗体を用いて検出した。低分

子化合物のスクリーニングする際には、96 穴プレートに抗-GST 抗体を固相化し、GST-Vpr 結合後に、低分子化合物 1 □□を添加して 1 時間反応後に Imp  $\alpha$ -His を加えた。

3) in vitro核移行解析：Digitonin処理HeLa細胞を用いた。GST-Vpr-GFP-Hisと組換え型 Imp  $\alpha$  および  $\beta$  を N 末端側に GST を持つ融合蛋白として大腸菌に発現させ、proteaseにて GST を切断した蛋白を用いた。

4) GST pull-down法：GST-Vpr-GFP-His と GST-Imp  $\alpha$ -His を大腸菌で発現・精製し、proteaseにより消化後に、Vpr-GFPと GST-Imp  $\alpha$ -His を精製した。GST-Imp  $\alpha$ -His を GSH ビーズに結合させ、次に Vpr-GFP を反応させると同時に低分子化合物 1 □□を添加した。Vpr と Imp  $\alpha$  の結合は抗-GST抗体を用いた Western Blot法で確認した。

5) 細胞傷害性試験：ミトコンドリアの活性を指標とする MTT法によって CD4陽性 Molt 4 細胞を用いて検証した。Molt4細胞を 96穴プレートに培養し、低分子化合物を 0、0.05、0.5、5 および 50  $\mu$ M を加え、96時間後に MTT を加え、OD690/540 nm の吸光度を測定した。

### 3. 研究結果

#### 1) ELISA binding 法の構築：

スクリーニングに用いるための ELISA 法を構築した。96 穴プレートに、抗 GST 抗体を固相化させ、精製した GST-Vpr、さらに Imp  $\alpha$ -His を結合させ、HRP 標識抗-Imp  $\alpha$  抗体を反応後に基質で発色させ、450nm の吸光度を測定した。最初に、最適な GST-Vpr と Imp  $\alpha$  のタンパク質量が 500ng であることを決定した。

次に、構築された系が、阻害効果を正確に測定出来るか否かを、Imp  $\alpha$  と結合し、Vpr の Imp  $\alpha$  への結合を競合的に阻害する核輸送担体 Imp  $\beta$  を添加することによって調べた。Imp  $\beta$  の添加により量依存的に、Vpr と Imp  $\alpha$  の結合が阻害されたことから、構築された系が Vpr と Imp  $\alpha$  の結合阻害を正確に測定できることが確認された。

#### 2) ELISA binding 法による低分子化合物のス

#### クリーニング：

構築した系を用いて、1500 種類の低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行った結果、Vpr の Imp  $\alpha$  の結合を阻害する 47 種類の低分子化合物をスクリーニングした。

#### 3) GST pull-down法による Vpr と Imp $\alpha$ の結合を阻害する低分子化合物の同定：

ELISA法によりスクリーニングした47種類の低分子化合物の内10種類が、GST pull down 法によってVprのImp  $\alpha$  の結合を阻害することが再確認された。

#### 3) in vitro nuclear import assay による低分子化合物の核移行阻害効果の確認：

GST pull down 法によって、特異的な結合阻害が見られた 10 種類の低分子化合物の、Imp  $\alpha$  を介した Vpr の核移行に対する効果を、*in vitro nuclear import assay* を用いて検討した。Vpr は Imp  $\alpha$  存在下で速やかに核内に移行するが、3 種類の低分子化合物 (X, Y および W) の添加によって、核移行の著しい減小が認められた。

#### 4) 細胞傷害性試験による低分子化合物の細胞傷害性の確認：

同定された化合物が治療薬に適しているかを検討するため、細胞への傷害性をミトコンドリアの活性を指標とする MTT 法によって調べた。CD4 陽性 Molt4 細胞を 96 穴プレートに培養し、2 種の化合物を 0、0.05、0.5、5、および 50  $\mu$ M の量で加え、96 時間後、MTT 活性を測定した。その結果、細胞傷害性を評価する指標として、細胞生存率が 50% のときの薬剤濃度の値は、X 剤は 20、Y 剤は 50 以上という結果となりました。*in vitro nuclear import assay* において 5  $\mu$ M で核移行を阻害したことから、2 つの薬剤は細胞傷害性の低い化合物であることが明らかとなった。

#### 5) 偽 HIV-1 感染実験による阻害効果の判定：

同定された化合物が HIV-1 感染を阻害できるか否かを偽 HIV-1 感染実験によって解析中である。

#### 6) Vpr と Imp $\alpha$ 複合体の X 線結晶構造解析：

Vpr と Imp  $\alpha$  複合体をそれぞれ大腸菌発現系を用いて大量発現し、アフィニティークラム等を用いて精製した後、両者を混合するこ