

とによって複合体が安定に形成されることをゲル濾過で確認した。この複合体の結晶化条件を現在蒸気拡散法によって探索中である。

4. 考察

Vpr と Imp α との結合を阻害する低分子化合物が Vpr の核移行をも阻害したことから、Vpr と Imp α の結合を標的にすることで、新たな抗-HIV-1 医薬の開発が強く期待される。

より低濃度でVprの核移行を阻害できる化合物を開発するために、化合物の官能基を変換し、新たな化合物の創成が必要である。

本研究は、ウイルスタンパク質と細胞内因子との結合を阻害するウイルス感染阻害薬のモデルとなると同時に、核内で複製する他のウイルスの核移行および感染阻害のモデルともなる。このように宿主因子との接点を標的にすることは、HIV-1 特有の遺伝子変異を回避する上でも有効である。

5. 結論

- ① Vpr と Imp α の結合阻害を正確に測定できる ELISA binding 法を構築し、1500 化合物をスクリーニングした。その結果、ELISA 法から 47 種類の低分子化合物がスクリーニングされ、GST pull down 法によって、10 種類の化合物が同定された。3 種類は Imp α によって促進される Vpr の核移行をも阻害した。現在、偽 HIV-1 感染実験を行って、HIV-1 複製における影響を解析中である。
- ② Vpr と Imp α 複合体の大量精製に成功し、結晶化条件を検討中である。

6. 研究発表

1) 論文発表

- ① Kamata M., Nitahara-Kasahara Y., Miyamoto Y., Yoneda Y., and Aida Y. Importin- α promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 79.6:3557-3564, 2005.
- ② Kuramitsu M., Hashizume C., Yamamoto, N, Azuma A., Kamata M., Yamamoto, N, Tanaka Y., and Aida Y. A novel role for Vpr of human immunodeficiency virus type 1 as a regulator of the splicing of cellular pre-mRNA. *Microbes Infect.* 7:1150-1160, 2005.
- ③ Azuma A., Matsuo A., Suzuki T., Kurosawa

T., Xiangfeng Z and Aida Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle arrest at the G₁ phase and apoptosis via disruption of mitochondrial function in rodent cells. *Microbes Infect.* in press.

- ④ Takahashi M., Tajima S., Okada K., Davis W.C, and Aida Y. Involvement of Bovine Leukemia Virus Tax in Induction and Inhibition of Apoptosis. *Microbes Infect.*, 7:19-28, 2005.
- ⑤ Tajima S., and Aida Y. Induction of expression of bovine leukemia virus (BLV) in blood taken from BLV-infected cows without removal of plasma. *Microbes Infect.*, 7:1121-1216, 2005.
- ⑥ Okada K., Nakae N., Muramochi K., Shan-ai Y., Ikeda M., Takami S., Hirata T., Goryo M., Numakunai S., Takeshima S., Takahashi M., Taima S., Konnai S., Onuma M., and Aida Y. Bovine leukemia virus high Tax molecular clone experimentally induces leukemia/lymphoma in sheep. *J VET MED SCI.*, 67:1231-1235, 2005.

2) 学会発表

- ① 張陰峰、倉光球、木全清典、山本典生、山本直樹、間陽子. Regulation of HIV-1 viral products expression by Vpr (novel role of HIV-1 pre-mRNA splicing) 第53回日本ウイルス学会学術集会、2005年、横浜.
- ② 鈴木辰徳、松田剛、笠原(仁田原)優子、間陽子. HIV-1 Vprと核内輸送アダプター因子 importin α の結合を阻害する低分子化合物のスクリーニング系の構築. 第53回日本ウイルス学会学術集会、2005年、横浜.
- ③ 宗田光峰、間陽子. HIV-1 Pre-integration complex (PIC)構成因子間の相互作用. 第53回日本ウイルス学会学術集会、2005年、横浜.
- ④ 松田剛、滝澤翔太、間陽子. HIV-1 Vprの核移行におけるimportin α 7の影響について. 第53回日本ウイルス学会学術集会、2005年、横浜.
- ⑤ 張陰峰、田中勇悦、間陽子. Regulation of HIV-1 viron protein expression by Vpr. 第19回日本エイズ学会学術集会、2005年、熊本.
- ⑥ 宗田光峰、山本典生、飯島沙幸、山本直樹、間陽子. HIV-1 Vpr変異体の感染初期に及ぼす影響. 第19回日本エイズ学会学術集会、2005年、熊本.
- ⑦ 鈴木辰徳、松田剛、間陽子. ELISA法によるHIV-1 Vprとimportin α との結合の測定とその結合阻害剤の探索. 第19回日本エイズ学会学術集会、2005年、熊本.

7. 研究危険情報 該当事項なし。

図1. VprとImp α の結合を正確に測定できる ELISA法の確立

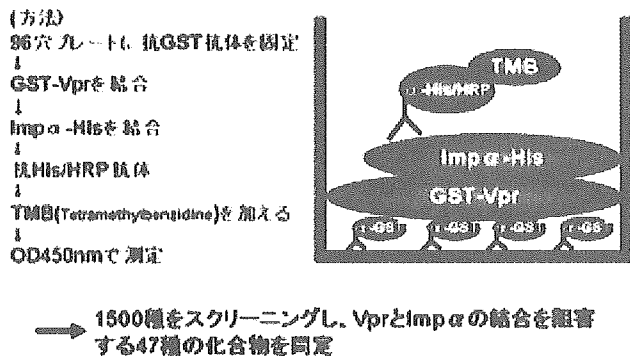


図2. 47種の低分子化合物を用いた GST pull down assay

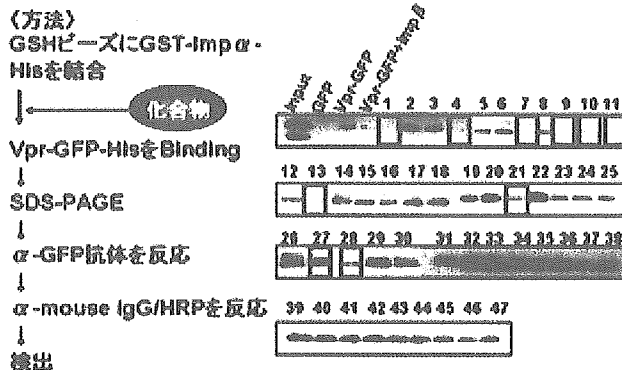


図3. Vprの核移行を阻害する低分子化合物

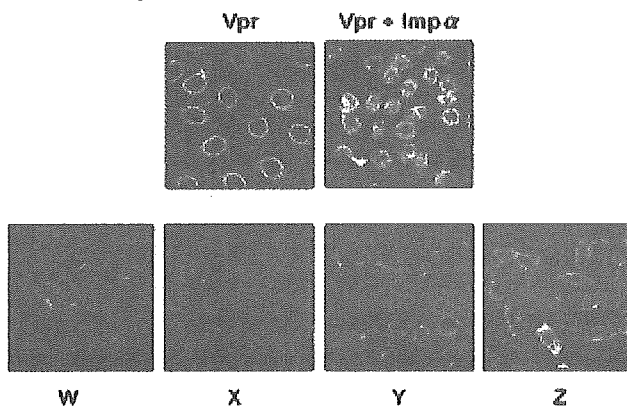


図4. 細胞傷害性試験結果

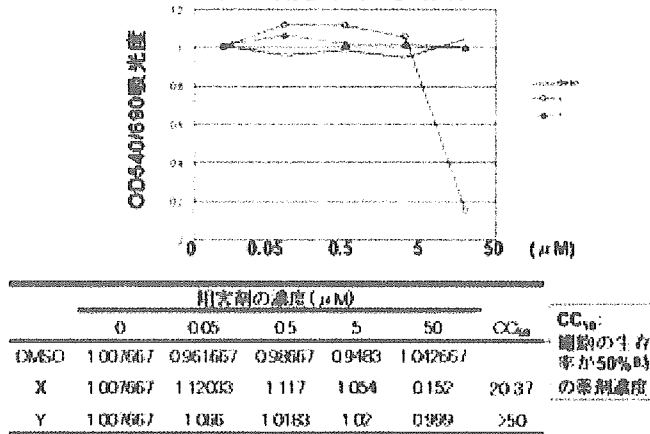


表1. スクリーニングされた低分子化合物のまとめ

方法	標的	陽性	陰性
ELISA binding assay	結合	47	1,453
GST pull-down assay	結合	10	37
Nuclear Import assay	核移行	3	7
同位蛍光抗体法	核移行		NT
MTT assay	細胞障害性	2 (1=NT)	
<i>in vitro</i> 感染実験	感染		NT

6. HIV-1 ゲノム動態に関与する宿主因子

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・免疫治療学分野）

研究要旨

近年、HIV ゲノムに作用し、感染成立を阻害する宿主因子（APOBEC, TRIM5）の存在が明らかにされた。しかしながら、HIV 感染初期過程におけるウイルスゲノム動態を支持する宿主因子の報告はほとんど知られていない。我々は HIV-1 インテグラーゼに結合する新規宿主因子として Gemin2 (SIP1)を同定した。Gemin2 は感染細胞に吸着／侵入後すみやかにインテグラーゼを介してウイルスゲノムと相互作用し HIV-1 の逆転写過程の進行をサポートしていることが示された。

A. 研究目的

近年、HIV ゲノムに作用し、感染成立を阻害する宿主因子（APOBEC, TRIM5）の存在が明らかにされた。しかしながら、HIV 感染初期過程におけるウイルスゲノム動態を支持する宿主因子の報告はほとんど知られていない。我々は HIV-1 インテグラーゼに結合する新規宿主因子として Gemin2 (SIP1)を同定した。本研究ではこの Gemin2 の HIV-1 複製における機能的関与を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) Yeast-two hybrid 法により HIV-1 インテグラーゼに結合する宿主因子のスクリーニングをおこなった。

2) GST-pull-down 法により HIV-1 インテグラーゼとヒト細胞（HeLa）endogenous Gemin2 との結合の確認とインテグラーゼの

Gemin2 との相互作用の責任ドメインの検討をおこなった。

3) ウイルス粒子内への Gemin2 の取り込みを濃縮精製 HIV 粒子内蛋白のウエスタンブロット解析により検討した。

4) FLAG-Gemin2 を発現させた細胞にウイルスを感染させ免疫沈降法により HIV-1 インテグラーゼおよびウイルス cDNA との相互作用を検討した。

5) 種々の siRNA により Gemin2 の HIV-1 複製各素過程への影響を検討した。

（倫理面への配慮：該当事項無し）

C. 研究結果

1) HeLa cDNA ライブラリー（ $\sim 2 \times 10^7$ クローン）より 5 つのインテグラーゼ結合活性クローンを得た。遺伝子配列解析結果より 3 つのクローンが Gemin2 の部分断片をコードしていた。酵母細胞（AH109 株お

よび HF7C 株) においてはこの Gemin2 の部分断片はインテグラーゼの C-末端領域 (212-288) と最も強く相互作用することが示された。

2) GST-インテグラーゼ (全長) はヒト培養細胞 (HeLa) で発現している endogenous Gemin2 と結合することを確認した。インテグラーゼの各ドメインを有する各 GST 融合リコンビナント蛋白断片化を用いた pull-down 解析より、HIV-1 インテグラーゼの C-末 (210-288) が Gemin2 との結合責任ドメインであるが、中央領域 (55-211) にも有意な結合能を確認した (図 1 A)。

3) ウイルス粒子内には Gemin2 およびその関連蛋白である SMN, Gemin3 は検出されなかった (図 1 B)。

4) FLAG-Gemin2 を発現させた細胞にウイルスを感染させ FLAG 抗体による免疫沈降解析により HIV-1 インテグラーゼはウイルス吸着/侵入後すみやかに (2 時間以内に) インテグラーゼと相互作用することを確認した (図 2 A)。また同免疫沈降分画には HIV-1cDNA (逆転写産物) が効率よく共沈することを確認した (図 2 B)。

5) siRNA により Gemin2 を knock-down した細胞にて調整したウイルスは感染性を保持しており、Gemin2 の欠損はウイルスの転写、翻訳、粒子形成、放出といった感染後期課程には顕著な影響を及ぼさないことを確認した。しかしながら、Gemin2 をあらかじめ knock-down した細胞にウイルスを感染させた場合、Gemin2 を knock-down 効率に依存性に感染性が抑制されることがわか

った。このウイルス感染初期過程への影響はとくにヒト末梢単核球血由来マクロファージ (MDM) において特に顕著に認められた (コントロール比で 1 - 10%) (図 3)。リアルタイム PCR 法による感染後のウイルス cDNA の定量および定性解析結果より、Gemin2 を knock-down した細胞では逆転写後期産物の合成および蓄積が顕著に低下していることを見いだした (図 4)。

D. 考察

HIV 感染初期過程におけるウイルスゲノム動態 (脱殻、逆転写、核内輸送) を支持する宿主因子の報告はほとんど知られていない。我々はインテグラーゼが本来のウイルスゲノムの宿主染色体への組み込みに加え、脱殻、逆転写、核移行等ウイルス感染初期過程の各ステップにも機能的に関与していることを明らかにしてきた。本研究結果は Gemin2 がインテグラーゼの新たな機能を仲介する宿主因子候補のひとつであることを示している。また、本研究結果は HIV-1 感染初期過程におけるウイルスゲノムの動態のシステム解明およびその制御法において新規知見をもたらすことが期待できることをしめした世界的にみても最初の報告といえる。

E. 結論

HIV-1 インテグラーゼに結合する新規宿主因子として Gemin2 (SIP1) を同定した。Gemin2 は感染細胞に吸着/侵入後すみやかにインテグラーゼを介してウイルスゲノムと相互作用し HIV-1 の逆転写過程の進行を

サポートしていることが示された。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 原著論文による発表

- 1) Harashima, N., Tanosaki, R., Shimizu, Y., Kurihara, K., Masuda, T., Okamura, J., and Kannagi, M. Identification of two new HLA-A*1101-restricted tax epitopes recognized by cytotoxic T lymphocytes in an adult T-cell leukemia patient after hematopoietic stem cell transplantation. *J Virol* **79**, 10088-92 (2005).
- 2). Kurihara, K., Harashima, N., Hanabuchi, S., Masuda, M., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Tomonaga, M., Ohashi, T., Hasegawa, A., Masuda, T., Okamura, J., Tanaka, Y. and Kannagi, M. Potential immunogenicity of adult T cell leukemia cells in vivo. *Int J Cancer* **114**, 257-67 (2005).
- 3). Ikeda, T., Nishitsuji, H., Zhou, X., Nara, N., Ohashi, T., Kannagi, M., and Masuda, T. Evaluation of the functional involvement of human immunodeficiency virus type 1 integrase in nuclear import of viral cDNA during acute infection. *J Virol* **78**, 11563-73 (2004).
- 4). Nomura, M., Ohashi, T., Nishikawa, K., Nishitsuji, H., Kurihara, K., Hasegawa, A., Furuta, R.A., Fujisawa, J., Tanaka, Y., Hanabuchi, S., Harashima, N., Masuda, T. and Kannagi, M.. Repression of tax expression is associated both with resistance of human T-cell

leukemia virus type 1-infected T cells to killing by tax-specific cytotoxic T lymphocytes and with impaired tumorigenicity in a rat model. *J Virol* **78**, 3827-36 (2004).

5). Nishitsuji, H., Ikeda, T., Miyoshi, H., Ohashi, T., Kannagi, M. and Masuda, T. Expression of small hairpin RNA by lentivirus-based vector confers efficient and stable gene-suppression of HIV-1 on human cells including primary non-dividing cells. *Microbes Infect* **6**, 76-85 (2004).

6). Emori, Y., Ikeda, T., Ohashi, T., Masuda, T., Kurimoto, T., Takei, M. and Kannagi, M. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by Z-100, an immunomodulator extracted from human-type tubercle bacilli, in macrophages. *J Gen Virol* **85**, 2603-13 (2004).

7). Zhou, X., Kubo, M., Nishitsuji, H., Kurihara, K., Ikeda, T., Ohashi, T., Azuma, M., Masuda, T., and Kannagi, M. Inducible-costimulator-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in CD4(+) T lymphocytes. *Virology* **325**, 252-63 (2004).

8). Harashima, N., Kurihara, K., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Hanabuchi, S., Masuda, M., Ohashi, T., Fukui, F., Hasegawa, A., Masuda, T., Takaue, Y., Okamura, J. and Kannagi, M. Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Res* **64**, 391-9 (2004).

(以下論文投稿中)

9) Hamamoto S., Nishitsuji, H., Teruo A., T.,

Kannagi, M. and Masuda, T. Identification of A Novel Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Interactor Gemin2 that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo (revised in J. Virol).

10) Nishitsuji, H., Kohara M., Kannagi, M. and Masuda, T. Effective Suppression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 through Combination of Short- or Long-hairpin RNAs Targeting Essential Sequences for Retroviral Integration (submitted).

2. 学会発表

1) 増田貴夫. HIV-1 ゲノム動態に関する新規宿主因子群. 第6回 熊本エイズセミナー(招待講演), 2005年,熊本.

2) 増田貴夫. HIV-1 ゲノム動態に関する新規宿主因子群とその制御 第53回 日本ウイルス学会(招待講演、シンポジウム), 2005年、横浜.

3) 西辻裕紀、久保誠、林隆也、小原道法、多比良和誠、神奈木真理、増田貴夫. shRNAによる HIV-1 複製阻害と逃避変異ウイルスの解析 第53回 日本ウイルス学会、2005年、横浜.

4) 林隆也、西辻裕紀、久保誠、増田貴夫、神奈木真理. 非特異免疫に対する HIV-1 Nef の影響 第53回 日本ウイルス学会、2005年、横浜.

5) 神奈木真理、原嶋奈々江、田野崎隆二、清水由起子、栗原清、岡村純、増田貴夫. 成人 T 細胞白血病 (ATL) への造血幹細胞移植によって活性化された Tax 特異的 CD8 陽性 T 細胞の HLA-A11 拘束性メジャーエピ

トープ. 第53回日本ウイルス学会、2005年、横浜.

6) 久保誠、西辻裕紀、栗原清、林隆也、増田貴夫、神奈木真理. Mycoplasma 感染した細胞培養上清中の HIV-1 複製抑制因子. 第53回 日本ウイルス学会、2005年、横浜.

7) 増田貴夫、西辻裕紀、濱本誠二、小櫃冴未、神奈木真理. 新規 HIV-1 インテグラーゼ結合因子 Gemin2 の機能解析. 第19回 日本エイズ学会、2005年、熊本.

8) 久保誠、西辻裕紀、栗原清、林隆也、増田貴夫、神奈木真理. HIV-1 複製抑制効果を有するマイコプラズマ由来の因子. 第19回 日本エイズ学会、2005年、熊本.

9) 林隆也、西辻裕紀、久保誠、増田貴夫、神奈木真理. NK 活性とサイトカイン産生に対する HIV-1 Nef の影響. 第19回 日本エイズ学会、2005年、熊本.

10) 西辻裕紀、久保誠、林隆也、神奈木真理、増田貴夫. shRNA による HIV-1 複製阻害と逃避変異ウイルスの解析. 第19回 日本エイズ学会、2005年、熊本.

H. 知的所有権の出願：なし

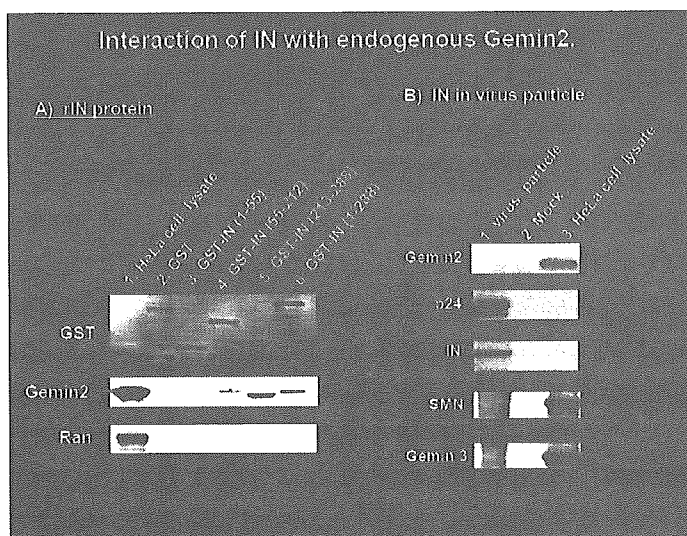


図 1 Gemin2 と HIV-1 インテグラーゼの相互作用

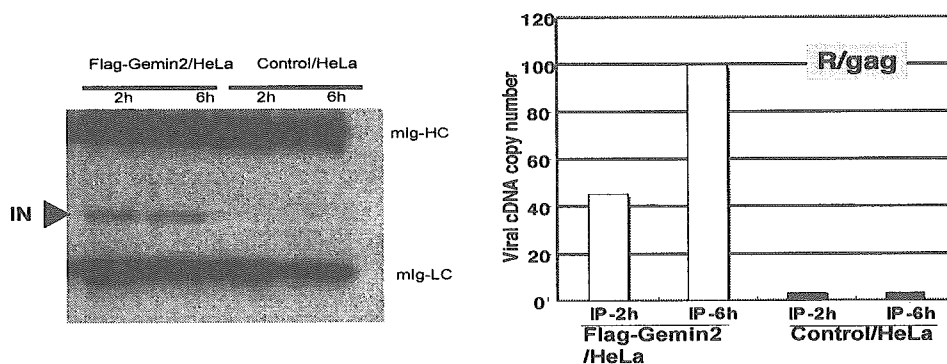


図 2 HIV-1 プレインテグレーション複合体と Gemin2 の相互作用

Effect of siGemin2 on HIV-1 infection in primary monocyte derived macrophage (MDM).

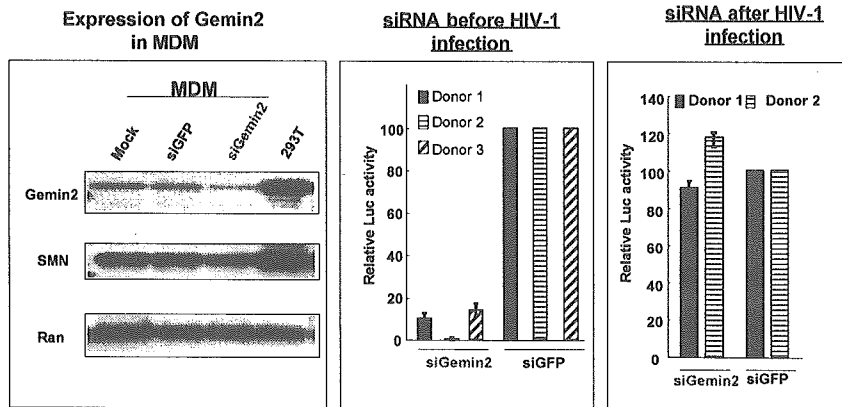


図 3 .siRNA による Gemin2 knock-down と HIV-1 感染

Effect of siGemin2 on HIV-1 reverse transcription and integration in MDMs.

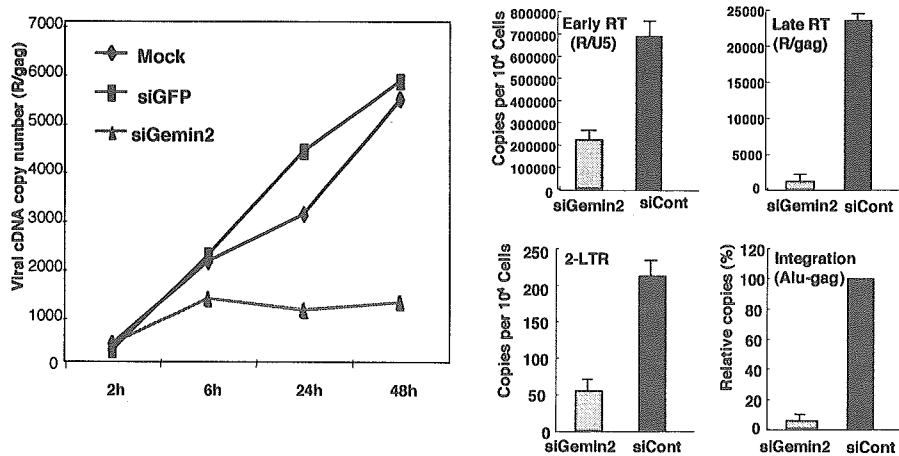


図 4. Gemin2 knock-down 細胞内での HIV-1 逆転写過程の阻害

7. HIV-1 複製に関わる宿主因子の同定とその機能解析

分担研究者 生田和良 (大阪大学微生物病研究所・教授)

協力研究者 亀岡正典、小路早苗、北川友紀子、水田浩之 (大阪大学微生物病研究所)

研究要旨 AIDS の病態進行とともに、HIV-1 感染者の CD38⁺ T 細胞の割合が増加することが知られている。私達は、健常者の末梢単核球 (PBMC) に由来する CD4⁺ T 細胞を CD38 サブセットに分画し、HIV-1 トロピズムについて検討した。その結果、CD38⁺分画が IL-4 依存的に X4 HIV-1 に高感受性を示した。両サブセット間で X4 HIV-1 の吸着、侵入、インテグレーション過程には大きな違いは見られず、転写過程において差異が生じており、転写因子である AP-1 が IL-4 依存的に CD38⁺サブセットにおいて活性化されていた。さらに、両サブセットについて GeneChip 解析を行ったところ、IL-4 処理 CD38⁺サブセットで認められ IL-4 未処理 CD38⁺サブセットと IL-4 処理 CD38⁻サブセットで認められないものとして約 20 遺伝子、逆に IL-4 処理 CD38⁻サブセットで認められ IL-4 未処理 CD38⁻サブセットと IL-4 処理 CD38⁺サブセットで認められないものとして 5 遺伝子を同定できた。そこで、本年度は、IL-4 処理 CD38⁺で認められた遺伝子群および IL-4 処理 CD38⁻で認められた遺伝子群の HIV-1 複製への影響について解析を行った。また、「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」に参画し、ヒトマクロファージ細胞株である J111 で HIV-1 感染を亢進および抑制する宿主因子の検索を行った。

A. 研究目的

AIDS 病態機序には、HIV-1 の主な標的細胞である CD4⁺ T 細胞のウイルス感受性 (トロピズムと複製効率) が関わる。CD4⁺ T 細胞は免疫機能によって、幾つかのサブセットに分けることができるが、各サブセット間の HIV-1 感受性の差異については不明な点が多い。私たちは、AIDS 病態進行とともに、CD38⁺/CD38⁻ T 細胞比が上昇する点に着目し、CD4⁺の両サブセットが感受性を示す HIV-1 トロピズムについて検討し、CD4⁺CD38⁺ T 細胞サブセットが X4 HIV-1 に高感受性を示すこと、この違いには IL-4 刺激によって引き起こされるウイルス転写過程にあることを見出した。そこで、IL-4 処理および未処理の両サブセットについて GeneChip 解析を行ったところ、IL-4 処理 CD38⁺サブセットでのみ認められたものとして 20 遺伝子、IL-4 処理 CD38⁻サブセットでのみ認められたものとして 5 遺伝子を同定することができた。そこで、本年度は、IL-4

処理 CD38⁻で認められた遺伝子群および IL-4 処理 CD38⁺で認められた遺伝子群の HIV-1 複製への影響について解析を行った。また、本研究班の「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」に参画し、ヒトマクロファージ細胞株である J111 における HIV-1 感染を亢進および抑制する宿主因子の検索を行った。

B. 研究方法

非感染ドナーの PBMC から MACS を用いて、活性化マーカー CD25⁺、HLA-DR⁺ の CD4⁺CD38⁺および CD4⁺CD38⁻サブセットを分離し、IL-4 または PHA 存在下で 3 日間培養を行った。培養後、全 RNA を回収し、半定量的 RT-PCR 法を行い、サブセット間の遺伝子発現を比較した。

HIV-1 LTR プロモーターに与える影響については、HIV-1 LTR の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子と RNF125 発現プラスミドを cotransfection し 24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。

HIV-1 タンパク質合成に与える影響につ

いては、HIV-1 proviral DNA (pNL4-3) と RNF125 発現プラスミドを cotransfection し、48 時間後に細胞上清中の p24 抗原を p24 ELISA により測定した。また、HIV-1 の RNA 合成については、pNL4-3 と RNF125 発現プラスミドを cotransfection し、48 時間後に細胞の全 RNA を回収し、HIV-1 Nef に対するプローブで Northern blotting を行った。

CD38⁺サブセットで認められた遺伝子群の HIV-1 増殖に与える影響について検討するため、各々の遺伝子に対する siRNA の合成を行った。これら siRNA を細胞に transfection し、48 時間後に組換え HIV-1 ウイルスを感染させ、さらに 48 時間後にウイルスの増殖をルシフェラーゼ活性により測定した。

一方、「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」については、J111 (ヒトマクロファージ由来株)、MAGIC5A、293T 細胞へそれぞれの siRNA を導入後、VSV-G シールド HIV-1 および pNL-BaL env 由来ウイルスを感染し、ウイルス産生における亢進または抑制能について検討した。

C. 研究結果

ヒトゲノム遺伝子約 40,000 個の GeneChip 解析により、CD38⁺サブセットで IL-4 処理により発現亢進する因子として 20 遺伝子が、反対に CD38⁻サブセットで IL-4 処理により発現亢進する因子として 5 遺伝子が同定された。そこで、半定量的 RT-PCR 法による解析を進めたところ、これら因子のうち、前者で 8 遺伝子、後者で 3 遺伝子が確認された。本年度は、IL-4 処理 CD38⁻サブセットで発現の高い遺伝子群の 1 つ、RNF125 について詳細な解析を行った。

1) CD4⁺ T 細胞を IL-4 で 3 日間刺激したところ RNF125 の発現が誘導されたが、PHA の 3 日間処理では、この発現誘導は認められなかった。CD4⁺ T 細胞を CD38⁺と CD38⁻サブセットに分画後に

IL-4 で 3 日間刺激したところ、CD38⁺に比べ、CD38⁻ T 細胞サブセットにおいて RNF125 のより顕著な発現が認められた。

- 2) RNF125 が HIV-1 増殖に影響を与える可能性について検討するため、RNF125 に対する siRNA を用いて細胞内の RNF125 タンパク質レベルを減少させた。その後組換え HIV-1 を感染させたところ、HIV-1 増殖の上昇が確認できた。
- 3) HIV-1 のウイルスタンパク質産生に与える影響を検討した。HIV-1 proviral DNA と RNF125 を cotransfection したところ、細胞上清中に放出されるウイルス粒子のレベルが RNF125 の用量依存的に抑制された。
- 4) RNF125 はそのアミノ酸配列から RING domain を持っていることから、タンパク質のユビキチン化を進める E3 ligase であることが推定される。RING domain の最初のシステインおよび一番目と二番目のシステインをアラニンに置換することで、E3 ligase 活性を欠失した変異体を作製できることが今までに報告されている。そこで、これらの変異体 (C37A および C37/40A) を作製し、HIV-1 proviral DNA と cotransfection を行ったところ、E3 活性を失った変異体は、細胞上清中へのウイルス粒子放出に抑制的には働かなかった。
- 5) HIV-1 proviral DNA と RNF125 を cotransfection した後、細胞内 HIV-1 RNA 量を調べたところ、RNF125 の用量依存的にウイルス RNA 量が減少していた。一方、C37A では抑制されなかった。
- 6) HIV-1 LTR からの転写への影響をルシフェラーゼアッセイ法により検討したところ、RNF125 の用量依存的に HIV-1 LTR からの転写が抑制された。これはヒト付着細胞 293T とヒト T 細胞株 Jurkat の両方において観察された。
- 7) 一方、CD38⁺サブセットで IL-4 処理によ

る発現亢進が認められた 8 遺伝子のうちの 3 遺伝子について、それぞれに対する siRNA を作製し、これら siRNA の HIV-1 増殖に与える影響について検討し、そのうちの 1 遺伝子に抑制効果が確認された。

- 8) 「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」については、J111 へ VSV-G シールド HIV-1 を感染する系においてウイルス産生を上昇させるものとして 5 遺伝子、反対に抑制させるものとして 6 遺伝子が同定された。これらの上昇または抑制効率は、MAGIC5A や 293T を用いた場合よりも J111 を用いた場合がもっとも顕著であった。pNL-BaL env 由来ウイルスの感染では、HIV-1 感染上昇に関わる上記 5 遺伝子のうち、4 遺伝子で同様の効果が認められた。

D. 考察

CD4⁺CD38⁺サブセットは X4 HIV-1 に高感受性である。この高感受性には、HIV-1 のレセプターおよびコレセプターの発現に関わるウイルス吸着・侵入段階の促進ではなく、転写過程の亢進に基づいていた。GeneChip 法で同定した CD4⁺CD38⁺サブセット特異的宿主遺伝子産物は、X4 HIV-1 の転写に抑制的に働くと考えられる。実際、その遺伝子産物の 1 つである RNF125 は HIV-1 LTR プロモーターからの転写を抑制することが明らかになり、その抑制活性には RNF125 の RING domain が必須であった。このことから、RNF125 は HIV-1 LTR プロモーターに作用する様々な転写因子、もしくは、その転写因子のシグナル経路に関わる宿主因子をユビキチン化することによって、HIV-1 LTR からの転写を間接的に阻害していることが示唆された。今後、RNF125 のユビキチン化標的分子を明らかにすることは、X4 HIV-1 複製機序の新たな機序解明につながると考えられる。

また、GeneChip 法で同定した CD4⁺CD38

⁺サブセット特異的遺伝子産物は、X4 HIV-1 の転写に促進的に働くことが考えられる。実際、siRNA を用いた実験により、HIV-1 の複製に影響を与えることを示唆する結果が得られた。これらの遺伝子についても HIV-1 との関わりを今後詳細に検討することによって、HIV-1 複製遮断法の開発へと発展させることができると考える。

一方、「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」に関する結果については、今後 HIV-1 複製のどの過程において機能している宿主因子であるのか、詳細な解析が必要である。これらの宿主因子についても、HIV-1 複製遮断法の開発へと発展する可能性がある。

E. 結論

HIV-1 の標的である CD4⁺ T 細胞のうち、CD38⁺サブセットは、IL-4 刺激により X4 HIV-1 の転写過程を亢進する因子を誘導し、一方 CD38⁻サブセットは、IL-4 刺激により X4 HIV-1 の転写過程を積極的に妨げる因子を誘導する。このうち、X4 HIV-1 の転写過程を積極的に妨げる因子の 1 つとして RNF125 を同定した。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. Komoto, S., Tsuji, S., Lee, B.J., Iwabu, Y., Kojima, Y., Otake, T., Taniguchi, K., and Ikuta, K.: Higher frequency of premature stop codon mutations at *vpu* gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE compared with those of other subtypes. *Microbes Infect.* 7, 139-147, 2005.
2. Isarangkura, P.N.A., Li, G.M., Warachit, J., Iwabu, Y., Tsuji, S., Auwanit, W., Yamamoto, D., Goto, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Ikuta, K.: Different susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to Env gp41-derived synthetic peptides corresponding to the two heptad repeat regions. *Microbes Infect.* 7, 356-364, 2005.

3. Li, Y.G., Iwabu, Y., Warachit, J., Kinomoto, M., Ibrahim, M.S., Tsuji, S., Mukai, T., Kameoka, M., Tokunaga, K., Sata, T., and Ikuta, K.: Interleukin-4 upregulates T-tropic human immunodeficiency virus type 1 transcription in primary CD4⁺ CD38⁺ T-lymphocyte subset. *Microbiol. Immunol.* 49, 155-165, 2005.
 4. 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 control fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J. Virol.* 79, 5996-6004, 2005.
 5. Yamamoto, D., Li, G.M., Ikuta, K., and Goto, T.: L(565)M mutation in HIV-1 glycoprotein 41 stabilizes the coiled-coil structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 112-116, 2005.
 6. Sakudo, A., Tsenkova, R., Onozuka, T., Morita, K., Li, S., Warachit, J., Iwabu, Y., Li, G., Onodera, T., and Ikuta, K.: A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy. *Microbiol. Immunol.* 49, 695-701, 2005.
 7. Kameoka, M., Nukuzuma, S., Itaya, A., Tanaka, Y., Ota, K., Inada, Y., Ikuta, K., and Yoshihara, K.: Poly(ADP-ribose)polymerase-1 is required for integration of the human immunodeficiency virus type 1 genome near centromeric alphoid DNA in human and murine cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 412-417, 2005.
 8. Kameoka, M., Nukuzuma, S., Itaya, A., Tanaka, Y., Ota, K., Ikuta, K., and Yoshihara, K.: RNA interference directed against poly(ADP-Ribose) polymerase 1 efficiently suppresses human immunodeficiency virus type 1 replication in human cells. *J. Virol.* 78, 8931-8934, 2004.
 9. Kinomoto, M., Mukai, T., Li, Y.-G., Iwabu, Y., Warachit, J., Palacios J.A., Ibrahim, M.S., Tsuji, S., Goto, T., and Ikuta, K.: Enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by replacing the region including Env derived from defective particles with an ability to form particle-mediated syncytia in CD4⁺ T cells. *Microbes Infect.* 6, 911-918, 2004.
- 2) 学会発表
- Shoji, S., Iwabu, S., Kameoka, M., Ikuta, K.: Human RNF125 is a host factor that blocks HIV-1 gene expression and viral multiplication. 7th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. July 1-5, 2005, Kobe, Japan.
- 亀岡正典、奴久妻聡一、板谷安佐子、田中康春、太田克矢、生田和良、吉原紘一郎。マウスおよびヒト細胞での HIV-1 増殖における PARP-1 の必要性について。第 53 回 日本ウイルス学会。
- 小路早苗、亀岡正典、岩部幸枝、生田和良。
T 細胞指向性 HIV-1 の転写に抑制的に働く新規宿主因子。第 53 回 日本ウイルス学会。2005。
- 岩部幸枝、Jiranan Warachit、小路早苗、亀岡正典、後藤俊幸、生田和良。B 型 HIV-1 持続感染細胞への AE 型重感染による強細胞傷害性ウイルスの出現。第 53 回 日本ウイルス学会。2005。
- 水田浩之、小路早苗、亀岡正典、生田和良。CD4+CD38+ T 細胞サブセットにおいて H4 HIV-1 の高感受性に寄与する宿主遺伝子の解析。第 53 回 日本ウイルス学会。2005。

8. HIV-1 粒子形成機構と宿主因子

分担研究者 森川裕子（北里大学 生命科学研究所）

研究要旨

エンドソーム輸送経路の遺伝子欠損変異酵母株を用いた網羅的解析で見いだしたHIV-1 Gag粒子形成に関する責任宿主因子が真の責任宿主因子か、ヒト細胞（293T及びHeLa細胞）で検証した。1) それら宿主因子のヒトホモログであるSyntaxin 6（トランスゴルジ～初期エンドソームに分布）及びSyntaxin 12（初期～後期エンドソームに分布）をRNA干渉でknock-downしたところ、HIV粒子産生が低下した。2) Syntaxin 6, 12, 16 (full size)をover-expressionさせると粒子産生量が増加した。一方、N末端半分あるいはC末端半分のconstructを共発現させるとdominant-negativeに粒子産生を阻害した。3) 膜貫通領域をもつSyntaxin（full-sizeあるいはC末端半分）を共発現させた場合には、p55Gag蛋白がSyntaxinとともに核周辺領域に共局在した。4) Syntaxin 12（full-size）を共発現させた細胞ではp17MA蛋白とSyntaxin 12が核周辺領域に共局在したが、こうした共局在はSyntaxin 6あるいは16（full-size）を共発現させた細胞ではわずかであった。以上の結果より、酵母細胞の遺伝子欠損変異株を用いてHIV Gag粒子形成の責任宿主因子として特定された初期及び後期エンドソームSyntaxinのヒトホモログがヒト細胞でもHIV Gag蛋白の細胞内輸送、粒子形成の責任宿主因子として機能すると結論された。

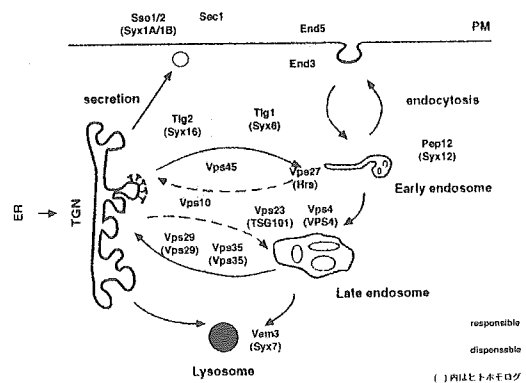
A. 研究目的

HIVの主構造蛋白であるGag蛋白は、cytosolでの蛋白合成後、膜にtargetingし、多量体形成によりGag粒子を形成して出芽する。近年、このGag蛋白の細胞内輸送や粒子出芽にエンドソーム経路の関与が示唆されている。我々はこのGag蛋白の細胞内輸送経路の概要を把握する目的で、エンドソーム輸送蛋白質群（target membraneに存在し膜融合に関与するSyntaxin群、後期エンドソームの輸送蛋白質Vps群、形質膜からのエンドサイトーシスに関与するEnd蛋白質群）の欠損あるいは変異酵母細胞株を用いて網羅的に解析したところ、驚いたことに酵母細胞では、1) 近年その関与が強く示唆されている、後期エンドソーム（特に、multi-vesicular body）のclass E Vps蛋白質（Vps27: Hrsホモログ、Vps23: TSG101ホモログ、Vps4）のいずれを欠損させてもGag蛋白質は形質膜にtargetingしウイルス粒子が産生される、2) 形質膜からのエンドサイトーシスに関与するend変異やSyntaxin（Pep12: 初期～後期エンドソームのSyntaxin、Tlg1及び2: トランスゴルジ～初期エンドソームのSyntaxin）を欠損させるとGag蛋白質はmistargetingしウイルス粒子産生量が減少する、との結果を

得た（図1）。

そこで本研究では、酵母細胞で同定したSyntaxinがHIV粒子産生における真の責任宿主因子か、ヒト細胞で検証した。

図1. Endosomal molecules responsible for intracellular transport of HIV-1 Gag in yeast



B. 研究方法

1) DNAの構築

Gag蛋白の発現にはHIV-1 cDNAクローン(pNL43株)あるいはpol領域欠損のクローン(pNL43/PR(D25N)ΔBal)を用いた。Syntaxin 6（トランスゴルジ～初期エンドソームのSyntaxin、酵母細胞で同定したTlg1

のヒトホモログ)、Syntaxin 12 (初期～後期エンドソームの syntaxin, 酵母細胞で同定した Pep12 のヒトホモログ)、Syntaxin 16 (トランスゴルジ～初期エンドソームの Syntaxin, 酵母細胞で同定した Tlg2 のヒトホモログ) の cDNA は、HeLa 細胞 cDNA ライブラリより PCR 法で単離し、CMV プロモーターをもつ pCMV-Tag2B vector の FLAG-tag 下流に挿入した。

2) RNA 干渉

RNAi の実験には 70-80% の knock-down 効率が保証された 19mer の syntaxin siRNA (B-Bridge 社) を final 50-100nM で用いた。real time RT-PCR による標的 syntaxin mRNA の定量及び Western blot による syntaxin の検出により、用いた siRNA の knock-down 効率を確認した。

3) 産生ウイルス粒子の検出

transfection 48 時間後の培養上清中に含まれる HIV-1 p24CA 量を ELISA キット (Zeptomatrix 社) で定量した。また、この培養上清を filter でろ過し 20% sucrose cushion を用いてウイルス粒子を濃縮した後、Western blot を行った。

4) Western blot

Gag 蛋白の検出には抗 HIV-1 p24CA 抗体、pCMV-Tag2B vector を用いて over-expression させた FLAG-Syntaxin の検出には抗 FLAG 抗体を、内在性の Syntaxin には抗 Syntaxin 6 及び 12/13 抗体を用いた。

5) 共焦点レーザー顕微鏡での観察

transfection 48 時間に細胞を 3.7% パラホルムアルデヒドで固定し、0.1% Triton X-100 で処理した後、抗 HIV-1 p17MA あるいは p24CA 抗体と抗 FLAG 抗体で反応させた。

(倫理面への配慮)

本研究では HIV 患者からの臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。実験遂行上の安全対策は、遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

C. 研究結果

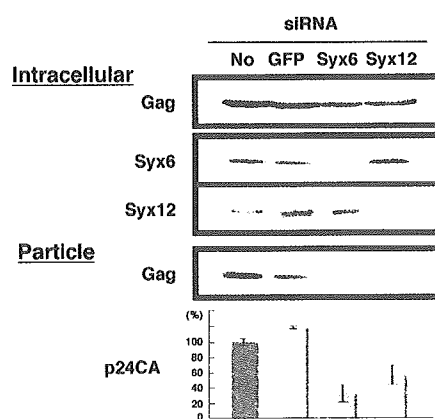
1) RNAi による Syntaxin の depletion

Syntaxin 6 及び 12 の mRNA を標的とする 19mer の siRNA を 293T 細胞に transfection した。Real time RT-PCR 及び Western blot により内在性 Syntaxin の depletion を確認

した。調べた範囲内では off-target 効果は認められなかった。

pNL43 あるいは pNL43/PR(D25N)ΔBal を co-transfection したところ、Syntaxin 6 あるいは 12 を deplete すると HIV 粒子産生量が顕著に減少することが判明した (図 2)。

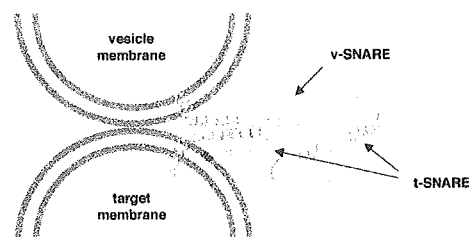
図 2. Syntaxin depletion による HIV 粒子産生抑制



2) Syntaxin の over-expression

すべての syntaxin は N 末端半分に 2 つのコイル構造を、C 末端半分に 1 つのコイル構造と膜貫通領域をもち、構造的に酷似する。しかしながら、その C 末端コイル構造によって形成される Syntaxin-SNAP-VAMP コイル複合体はそれぞれの target membrane と vesicle membrane の特異性を識別している (図 3)。

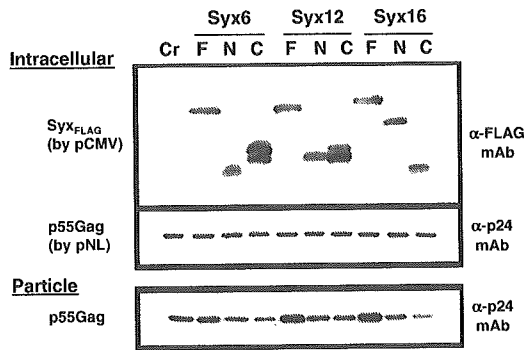
図 3. Structure of Syntaxin in a SNARE complex



そこで、これら syntaxin を N 末端と C 末端半分にわけ over-expression させた。pNL43 あるいは pNL43/PR(D25N)ΔBal を transfection した細胞に Syntaxin (full-size) を共発現させると HIV 粒子産生量が増加した。逆に、Syntaxin (N 末端半分、C 末端半分) を共発現させると、粒子産生量が減

少することが判明した (図4)。

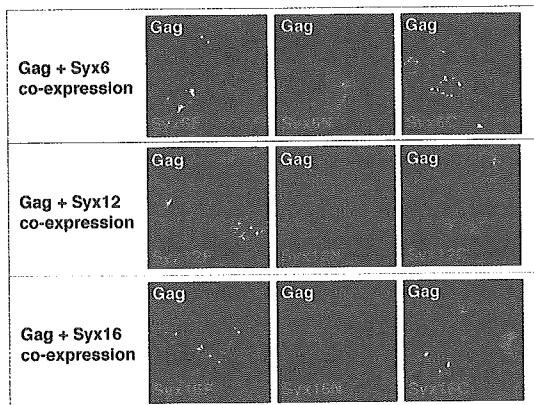
■ 4. Over-expression of Syntaxin (full-size, N'-half, C'-half)



3) p55Gag 蛋白/p17MA 蛋白及び Syntaxin の細胞内局在

FLAG-Syntaxin と pNL43/PR(D25N) ΔBal を co-transfection し、p55Gag 及び Syntaxin の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。pNL43/PR(D25N)ΔBal 単独発現細胞では Gag 蛋白は細胞質に broad に観察されたのに対し、Syntaxin (full-size) を共発現させた細胞では Gag 蛋白が Syntaxin (full-size) とともに核周辺領域に共局在した。Syntaxin (N 末端半分) を共発現させた場合には、Syntaxin も Gag 蛋白も細胞質に broad に観察された。これに対し、Syntaxin (C 末端半分) を発現させた場合には Gag 蛋白が Syntaxin (C 末端半分) とともに核周辺領域に共局在した。Syntaxin 6, 12, 16 のいずれの Syntaxin でも、また 293T, HeLa のいずれの細胞でも、同じ傾向が認められた (図5)。

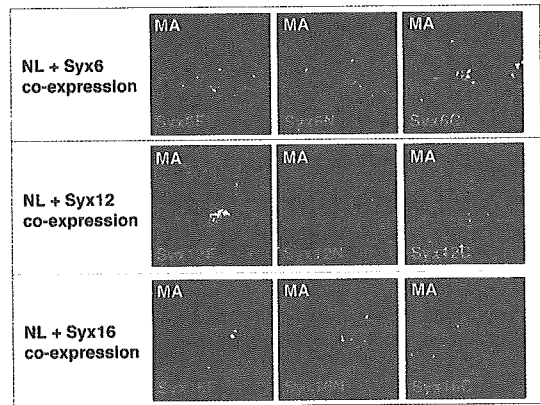
図 5. Colocalization of Gag & Syntaxin (in HeLa)



p55Gag 蛋白は粒子出芽に伴って、p17MA,

p24CA, p7NC, p6 に切断され、多くの抗 p17MA 抗体はその切断された p17MA 蛋白のみと反応し、未切断の p55Gag 蛋白と反応しない。そこで、FLAG-Syntaxin と pNL43 を co-transfection し、切断 p17MA 蛋白のみと反応する抗 p17MA 抗体を用いて粒子出芽の場と Syntaxin の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。Syntaxin 12 を共発現させた細胞では p17MA 蛋白と Syntaxin (full-size) が核周辺領域に共局在した。一方、Syntaxin 6 あるいは 16 (full-size) を共発現させた細胞では p17MA 蛋白と Syntaxin (full-size) はわずかにしか共局在しなかった。これに対し、Syntaxin (N 末端半分及び C 末端半分) を共発現させた場合には、Syntaxin 6, 12, 16 のいずれの Syntaxin でも、FLAG-Syntaxin (N 末端半分及び C 末端半分) の発現させた細胞では p17MA 蛋白が検出されない傾向が認められた (図6)。

図 6. Colocalization of MA & Syntaxin (in HeLa)



D. 考察

膜融合は t-SNARE (Syntaxin と SNAP) と v-SNARE (VAMP) のコイル複合体形成による反応である (図3)。本研究で対象とした3つの syntaxin のうち、Syntaxin 6 は構造的には syntaxin 群に分類されるものの機能的には SNAP 群に分類される分子である。本研究では、RNA 干渉で Syntaxin 6 及び 12 を knock-down すると HIV 粒子産生が低下し (図2)、逆に over-expression させると粒子産生量が増加したことから (図4)、これら Syntaxin がヒト細胞でも HIV Gag 蛋白の細胞内輸送、粒子形成の責任宿主因子であると結論された。このように Syntaxin (full-size) の over-expression は粒子産生量を増

加させたが、N末端半分やC末端半分の construct では粒子産生量の減少が認められた(図4)。これは dominant-negative な効果と推測された。

いずれの Syntaxin もC末端側に膜貫通領域をもつため、N末端半分の construct では可溶性蛋白質の性状を示すと予測された。事実、N末端半分の発現させた場合には、膜貫通領域を欠くため細胞質に broad に分布し、full-size のものが示すような特定の局在性を失った。一方、C末端半分のものでは膜貫通領域が保持されているため、full-size のものと同様に核周辺領域に局在した。こうした Syntaxin construct と HIV p55Gag 蛋白を共発現させると、N末端半分の construct の場合には Gag 及び Syntaxin のいずれも細胞内に broad に存在したままであったが、膜貫通領域をもつ construct (full-size やC末端半分のもの)の場合には Gag 蛋白が Syntaxin の局在部位である核周辺領域に recruit される現象が観察された(図5)。

次に、pNL43 を co-transfection して粒子出芽の場と Syntaxin の細胞内局在の関連を調べたところ、Syntaxin 12 (full-size) を共発現させた細胞では p17MA 蛋白と Syntaxin 12 が核周辺領域に共局在することが判明した。こうした p17MA 蛋白と Syntaxin (full-size) の共局在は Syntaxin 6 あるいは 16 (full-size) を共発現させた細胞ではわずかであった。この結果は Syntaxin 12 の局在部位である核周辺領域に HIV 粒子が出芽した可能性を示唆する(図6)。

これに対し、Syntaxin (N末端半分及びC末端半分)を共発現させた場合には、Syntaxin 6, 12, 16 のいずれの Syntaxin でも、Syntaxin (N末端半分及びC末端半分)を発現させた細胞では p17MA 蛋白が検出されない傾向があった(図6)。これは Syntaxin (N末端半分、C末端半分)が粒子産生に dominant-negative に機能した結果(図4)と理論的に一致する。

preliminary data であるが、膜貫通領域をもつ Syntaxin (full-size あるいはC末端半分)を共発現させた場合にはいずれの Syntaxin でもそれらが粒子内に取り込まれることを見いだしている。この結果は、Gag 蛋白がこれら Syntaxin と結合する可能性を示唆するものの、免疫沈降実験では Gag-Syntaxin の共沈は認められていない。

近年、酵母 Two-Hybrid System を用いて、HIV Gag 蛋白の L domain に結合する宿主因子として後期エンドソーム(特に、multi vesicular body)の class E Vps 蛋白(TSG101, AIP1/ALIX 等)が単離され、これらの宿主因子が HIV 粒子出芽の責任宿主因子であることが示唆されている。しかしながら、Gag 蛋白がどのような細胞内輸送経路を経てその粒子出芽の場(形質膜や細胞内膜小器官)に到達するのか、その責任宿主因子は何なのかは解明されていない。また、class E Vps 蛋白だけでは「リンパ球系細胞では TSG101 が結合する L domain がなくても粒子出芽できる」現象を説明できない。本年度の研究では、Syntaxin6, 12, 16 が HIV Gag 蛋白の細胞内輸送の責任宿主因子であると同定できたが、class E Vps 蛋白質(TSG101 ホモログや Vps4)の cell-type 依存性(マクロファージ系 vs リンパ球系)については解析できなかった。

E. 結論

酵母細胞の遺伝子欠損あるいは変異株を用いて HIV Gag 粒子形成の責任宿主因子として特定された初期及び後期エンドソーム Syntaxin のヒトホモログを RNA 干渉で knock-down したところ、HIV 粒子産生が低下し、over-expression させると粒子産生量が増加したことから、これら Syntaxin がヒト細胞でも HIV Gag 蛋白の細胞内輸送、粒子形成の責任宿主因子として機能すると結論された。

F. 知的所有権の取得状況 なし

G. 研究発表

学会発表

1. 森川裕子、鶴谷直美、後藤俊幸
酵母遺伝変異株を用いた HIV 粒子形成機構と宿主因子の解析

第53回日本ウイルス学会、2005年、東京

2. 鶴谷直美、百瀬文隆、森川裕子

HIV Gag 蛋白の細胞内輸送及び粒子形成における責任宿主因子の関与

第53回日本ウイルス学会、2005年、東京

3. 百瀬文隆、川口敦史、森川裕子、永田恭介
宿主因子発現抑制細胞におけるインフルエンザウイルス RNA 合成反応の解析

第53回日本ウイルス学会、2005年、東京

4. 永田恭介、百瀬文隆、杉山賢司、滝沢直己、
内藤忠相、村野健作、加藤広介、奥脇暢、森川裕子

ウイルスゲノムの複製・転写と宿主因子
第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年、福
岡

5. 百瀬文隆、川口敦史、岩松明彦、森川裕子、
永田恭介

インフルエンザウイルス RNA 複製・転写に
関わるスプライシング因子の機能
第 28 回日本分子生物学会年会、2005 年、福
岡

分担研究報告書

9. Vif 機能制御（Vif およびその結合因子の構造機能解析）

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)

研究要旨 HIV-1 複製に必須な Vif の構造機能について解析し、以下の結果を得た。(1) HIV-1、HIV-2 および SIV_{agm} 由来の Vif、また、それらの変異体は無細胞系や大腸菌等で発現させても立体構造決定用の可溶性 Vif は得られなかった。しかし、Vif を Elongin B および Elongin C と大腸菌 BL21 (DE3) 株で共発現させたところ、可溶性 Vif が得られた。(2) HIV-1 の種特異的増殖（ヒト細胞で増殖するがサル細胞では増殖できない）のウイルスゲノム上の決定領域を SIV_{mac} とのキメラウイルスを用いて解析した。各種キメラウイルスのカニクイザル由来リンパ球細胞株 HSC-F での増殖能から、*gag* 遺伝子（シクロフィリン A 結合ループをコードする領域）および *vif* 遺伝子が決定因子であることが明らかになった。サルおよびヒト細胞で増殖するキメラウイルスは全ウイルスゲノムの約 94% が HIV-1 由来であった。(3) サル細胞への馴化実験から、サルおよびヒト細胞指向性 HIV-1 のサル細胞での増殖速度はその *env* 遺伝子に影響されることがわかった。

A. 研究目的

HIV-1 Vif は自然宿主細胞でのウイルス複製に必須であるが、その立体構造は未解明のままである。世界中の研究室で構造解析用試料調製が試みられているが、未だに成功していない。新規の抗 HIV-1 創薬研究等に向け、Vif 構造解析は急務である。Vif の作用機構に関しては、非許容細胞内標的分子 APOBEC3G の同定により、分子生物学的理解が飛躍的に進展してきている。本年度は、Vif の立体構造解明を目標に Vif の可溶化を試みるととも

に、Vif と HIV-1 の種特異的増殖能の関係について解析した。可溶性 Vif を得るため、関連蛋白質との共発現を試みた。また、種特異的増殖に関するウイルスゲノム上の決定領域を同定するため、HIV-1 と SIV_{mac} 間でキメラウイルスを構築し、そのサル細胞での増殖能を解析した。

B. 研究方法

1. HIV-1 Vif (pNL432) を Elongin B および

Elongin C と大腸菌 BL21 (DE3) 株で共発現させ、Vif の可溶性を SDS-PAGE で確認した。

2. HIV-1 (pNL432) に SIVmac (pMA239) の *gag* 遺伝子の一部 (HIV-1 のシクロフィリン A 結合領域に対応する領域) あるいは *vif* 遺伝子を挿入置換して得られた感染性クローン、および両方の置換を持つ感染性クローンの細胞指向性を解析した。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒトと動物を用いた研究は行っていない。

C. 研究結果

1. 立体構造決定を目指した HIV-1 Vif の発現系の検討 (東京大学/理化学研究所 横山茂之教授等との共同研究)。これまで、HIV-1 Vif およびその種々の変異体、SIVagm Vif、HIV-2 Vif の発現および可溶化を無細胞系、大腸菌を用いた系などで調べた。その結果、ほとんどの試料において発現は見られたが、その全ては可溶化しなかった。今回、ElonginB および ElonginC との共発現を調べたところ、可溶化させることができた。

具体的には、プラスミド pCDF-1b (Novagen) に ElonginB および ElonginC の塩基配列を挿入し、2つの蛋白質が同時に発現するベクター pCDF-EloBC を構築した。このベクターで大腸菌 BL21 (DE3) 株を形質転換し、コンピテントセルを作製した。次に HIV-1 Vif の発現ベクター pET19-Vif (His タグ) を用いて2段階目の形質転換を行い、コロニーを選択した。

これを LB 培地で培養し IPTG で発現誘導した後、20、25、30 度の各温度において蛋白質を発現させた。菌体を 200 mM NaCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM β-ME を含む緩衝液に懸濁し、超音波破碎した。SDS-PAGE により調べたところ、20 および 25 度で可溶化が見られた。次に塩濃度および pH が可溶化効率に与える影響を調べた。500 mM NaCl では、50 mM、200 mM と比較して可溶化効率が低下した。pH は 7.0 から 8.5 まで変えても可溶化効率は同等であった。

次に、大腸菌の大量培養により HIV-1 Vif と ElonginB および ElonginC を大量発現、可溶化させて、精製条件の検討を行った。超音波破碎したものを遠心分離し、上清をニッケルカラムに通して一段階目の精製を行なった。次にバッチ法により、陽イオン交換樹脂には吸着しないが陰イオン交換樹脂およびヘパリンに吸着することを確認した。さらにカラム法により大量精製条件を検討した。陰イオン交換樹脂では pH7.0、pH8.5 どちらの条件においても大腸菌由来の夾雑物から効果的に分離されなかった。一方ヘパリンを用いて夾雑物からの分離ができた。この精製物において、HIV-1 Vif の His タグをエンテロキナーゼを用いて切断することを試みたが、Vif の分解が見られた。そこで、His タグを切断せずに沈殿剤等の結晶化条件を検討した。市販のスクリーニングキットを用いてハンギングドロップ法によりスクリーニングを行ったが、ほとんどの条件で非特異的な凝集沈殿を生じ結晶化には至らなかった。

2. HIV-1 の種特異的増殖における Vif の役

割。今回構築した感染性（ヒトリンパ球細胞株 M8166 で増殖する）キメラクローン NL-Sca（シクロフィリン A 結合ループ対応領域が SIVmac 由来）、NL-Svf (*vif* 遺伝子が SIVmac 由来)、NL-ScaV（シクロフィリン A 結合ループ対応領域と *vif* 遺伝子の両方が SIVmac 由来）および NL-ScaV (NL-ScaV の *vif* 遺伝子欠損体) のうち、NL-ScaV のみがカニクイザル由来リンパ球細胞株 HSC-F で増殖した。NL-ScaV はシングルサイクルでの感染実験でも、ヒトおよびサル（カニクイザルおよびアフリカミドリザル）由来の APOBEC3G を不活性化し、また、サル細胞（カニクイザルおよびアフリカミドリザル）でのポストエントリーのウイルス複製効率が親株である NL432 より有意に上昇していることが確認された。NL-ScaV のゲノムの約 94% は HIV-1 由来である。NL-ScaV を HSC-F 細胞で馴化させることにより増殖速度の速いウイルスが得られたので、分子クローン化を行なった (NL-DT5)。ゲノムの塩基配列を親ウイルス NL-ScaV と比較したところ、*env* 遺伝子の二か所が変異していることがわかった。これらの変異を NL-ScaV に導入すると HSC-F 細胞でのウイルス増殖効率が増強された。

D. 考察

1. HIV-1 Vif の可溶化は未だ報告されていない。我々も、無細胞系や大腸菌あるいは昆虫細胞での HIV-1 Vif の発現には問題なく成功してきたが、全て不溶性となっていた。これまでは Vif の単独発現であったが、今回 Elongin B および Elongin C と

の共発現で可溶性 Vif を得ることに初めて成功した。しかし、結晶化には至っていないため、今後は、まず Vif からタグの切断を検討し、タグを切り離したもので沈殿剤等の結晶化条件を検討したい。不成功の場合は、Vif に変異を導入したもので結晶化を試みたい。

2. HIV-1 がサル細胞で増殖するためには、SIVmac の *gag* 遺伝子の一部 (HIV-1 のシクロフィリン A 結合領域に対応する領域) および *vif* 遺伝子が必須であることが明らかになった。サル細胞に感染・増殖するキメラ HIV-1 (NL-ScaV) はゲノムの約 94% が HIV-1 由来である。NL-ScaV のカニクイザル由来 HSC-F 細胞での馴化実験から、このウイルスの増殖能には *env* 遺伝子が大きな影響を与えることもわかった。今後は、カニクイザルのみならずアカゲザル由来細胞株でもウイルス馴化実験を行ない、ゲノムの変化を検証する予定である。また、サル・ヒト細胞指向性 X4 ウイルスである NL-DT5 の *env* 遺伝子に R5 や R5-X4 の対応領域 (V1-V4) を挿入して構築した NL-DT5/SKB、NL-DT5/YKB および NL-DT5/8KB の細胞指向性や増殖速度等についても検討する予定である。これらの結果を総合して、HIV-1 の個体内ウイルス増殖および病原性発現の解析に最も適したサル・ヒト細胞指向性 HIV-1 を構築する。

E. 結論

本研究での可溶化の成功により、Vif 立体構造解明への基礎が築かれた。さらに、本研究により、Vif は HIV-1 の種指向性に極めて重要であることが明らかになり、新し