

図4. GFP 陽性Nef(Ad-nef)、Nef変異体(Ad-nef(mu))発現あるいは非発現(Ad-control)CD4陽性T細胞をFACSを用いて精製し、OVA₃₂₃₋₃₃₉でパルスした抗原提示細胞で刺激し刺激後3日目の培養上清中のIL-2およびIFN-γの量をELISAにより測定した。

Nef 発現細胞で認められた T 細胞反応の低下が、活性化後の細胞死亢進によるという可能性を検討するために、T 細胞に AICD を誘導し、アポトーシスの割合を解析した。その結果、Nef 発現細胞と非 Nef 発現細胞の間に有意な差は認められず、Nef 発現細胞で認められた T 細胞応答の低下は、Nef による T 細胞機能修飾が原因で起こる可能性が示唆された (図 5)。

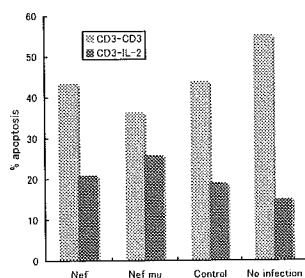


図5 CD4⁺T細胞にAICDを誘導した際のアポトーシスの割合

図はCD3刺激後、再度抗CD3で刺激し(CD3-CD3)あるいは対象として培養液を加え(CD3-IL-2)その後の細胞死を測定した。

Nef 発現 T 細胞の生体内での機能を確認する目的で、同系マウスに nef 発現細胞あるいは nef 非発現細胞を移入し、OVA/CFA で免疫後の所属リンパ節への移入細胞数の集積を測定した。合計 3 回の実験を行った結果、nef 発現細胞は nef 非発現細胞に比べて所属リンパ節への集積が著しく減弱することが明らかとなった (図 6)。この効果 CD4 抑制機能を失った変異体を発現する T 細胞においても同等であった。以上の結果は nef 発現により抗原刺激 T 細胞のリンパ節へのホーミングが阻害されることが明ら

かとなった。

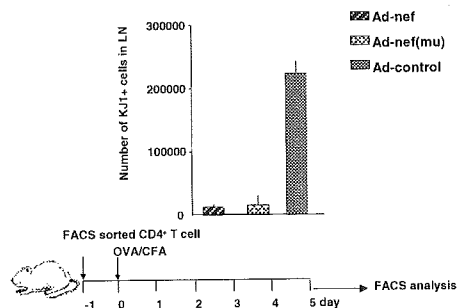


図6 2x10⁶のnef陽性CD4陽性D011.10 T細胞をBALB/cに移入し1日後に抗原(OVA/CFA)免疫した。免疫後5日目に所属リンパ管中のD011.10 T細胞数をFACSにより測定した。

Nef 発現細胞のリンパ節への集積の異常が T 細胞特異的ケモカインに対する反応性の低下によるか否かを検討するために、in vitro 遊走試験を行った。その結果、Nef 発現細胞は Nef 非発現細胞に比べて、CXCL12 および CCL19 に対する遊走能の低下を認めた。しかし、これらのケモカインに対するレセプター発現の低下は認められず、またこの効果は、CD4 発現抑制に影響されなかった (図 7)。以上の結果より、Nef 発現 T 細胞において、末梢 T 細胞がリンパ組織へ遊走する為に必要なケモカインに対する反応性が低下していることが判明した。

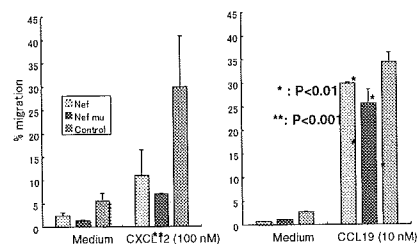


図7 T細胞遊走能に対するNef発現の影響

図は、5x10⁵個のnef陽性CD4陽性細胞のケモカインCXCL12またはCCL19に対する遊走能をトランスウェルを用いて測定した。遊走した細胞の割合はFACSを用いて測定した。

更に nef 発現 T 細胞の機能変化を明らかにするために、NP-CG 感作 B 細胞とともに nef 発現細胞、nef 変異体発現細胞、あるいは nef 非発現細胞を免疫不全 SCID マウスに移入し、NP-OVA 免疫で惹起される NP に対する抗体産生応答を測定した (図 8)。

その結果、nef 発現細胞では nef 非発現細胞と比べて抗体産生のヘルパー活性が 20 分の 1 以下に低下していることが判明した。さらに、CD4 発現抑制機能を欠いた nef 変異体でも nef 非発現細胞と比べ抗体産生が約 4 分の 1 に低下していることから、ヘルパー機能低下は、nef の CD4 発現抑制機能に一部依存するものの、大部分は CD4 発現抑制機能に非依存的であることが明らかとなった。

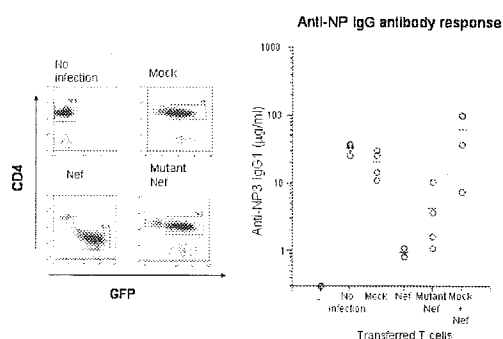


図8 Nef発現がヘルパー機能に及ぼす影響。左はT細胞のFACSパターンを示し、これらの細胞のGFP陽性分画をFACSで精製して移入した右はレシビエントマウスの2次抗体産生応答を示す。

以上の結果より、成熟 T 細胞での nef 発現は、T 細胞株、生体内での細胞動態と免疫反応に大きく影響を及ぼす可能性が示唆された。

D. 考察

HIV ウイルス感染初期に誘導される免疫異常や免疫不全に nef の発現が重要な役割を果たすことはこれまでに多くの試験管内の実験から推測されている。Nef の発現により CD4 抗原、MHC class I の発現低下をはじめ、細胞内シグナル分子との結合によりアポトーシス阻害の誘導等が報告されている。しかし nef が個体レベルでどのような機序で免疫不全に関わるか不明であった。一方 nef トランスジェニックマウスにおいて、AIDS 様病態の発症に伴う免疫反応異常が認められるという報告があるが、nef が胸腺内分化における T 細胞から発現して

いるので、これらの結果が、胸腺内 T 細胞分化異常を反映するかあるいは免疫反応時における T 細胞機能異常を反映するか明らかでない。

本研究では我々が確立した、nef 組み込みアデノウイルスの末梢成熟 T 細胞への感染モデル系を用いて、nef 発現により成熟 T 細胞の抗原刺激に対する反応の減弱、T 細胞の CXCL12 および CCL19 に対する遊走能の低下、さらに生体内における B 細胞へのヘルパー機能とダイナミクス異常が誘導される可能性を示した。これらの T 細胞免疫応答抑制が、細胞死やケモカインレセプター発現の低下を伴わないことから、nef が T 細胞レセプターやケモカインレセプターの細胞内シグナルを修飾しその結果 T 細胞免疫不全を誘導した可能性が考えられる。今後 nef 発現による T 細胞機能障害に関する分子生物学的な解析が必要である。

E. 結論

マウスモデルシステムを用い、成熟 T 細胞への nef 発現により T 細胞機能発現が低下することが明らかとなった。すなわち抗原提示細胞を介した抗原刺激に依存する試験管内での細胞増殖の減弱、さらに抗原刺激後に所属リンパ節に集積する活性 T 細胞数の減少が観察された。更に nef 発現により T 細胞のヘルパー機能が阻害された。これらの結果は、nef 発現が CD4⁺ T 細胞の生体内組織における抗原特異的免疫応答を抑制し、HIV 感染に伴う免疫不全の要因の一つであることが強く推察された。

F. 研究発表

1. 学会発表

[The Awaji International Forum on Infection

and Immunity, 2003]

- (1) H. Fujii, T. Nakayama, M. Taniguchi,
T. Takemori : Expression of HIVnef
impairs the antigen-specific T cell
response.

[第 53 回日本ウイルス学会総会、2003 年
10 月]

- (2) 藤猪英樹、藤井陽一、竹森利忠「HIVnef
による成熟 T 細胞の機能異常」

[第 54 回日本ウイルス学会総会、2004 年
11 月]

- (3) 藤猪英樹、竹森利忠「HIVnef 発現によ
り誘導される成熟 T 細胞の機能異常」
第 54 回日本ウイルス学会総会、2004
年 11 月

[第 33 回日本免疫学会総会、2003 年 12 月]

- (4) 藤猪英樹、中山俊憲、谷口克、竹森利
忠「HIVnef 発現により誘導される成熟
T 細胞の機能異常」

[第 34 回日本免疫学会総会、2004 年 12 月]

- (5) 藤猪英樹、中山俊憲、谷口克、竹森利
忠「HIVnef 発現により誘導される成熟
T 細胞の機能異常」

[第 35 回日本免疫学会総会、2005 年 12 月]

- (6) 藤猪英樹、阿戸学、高橋宜聖、橋本修
一、中山俊憲、谷口克、小安重夫、竹
森利忠「HIVnef 発現により誘導される
成熟 T 細胞の機能低下」(ポスター)

G. 知的所有権の出願・登録状況 (予定を
含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

「HIV の感染過程や病原性に関わる宿主因子の解析とその抑制に関する研究」

小柳義夫 京都大学ウイルス研究所・エイズ研究施設感染病態研究領域教授

分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
共同研究者 蝦名博貴 東北大学医学系研究科 大学院生
共同研究者 青木 淳 東北大学医学系研究科 大学院生
共同研究者 芳田 剛 京都大学医学研究科 大学院生

研究要旨

HIV 感染に必須あるいは抑制的働く細胞性因子の探索研究を行った。まず、HIV が細胞内に侵入後、その RNA ゲノムが逆転写され cDNA 合成後核内に移行して、染色体にインテグレーションするまでの過程において、cDNA の核内移行メカニズムはほとんど明らかになっていない。そこで、ウイルス cDNA の核内移行に必須な細胞因子の検索を行った。その結果、Nup98、もしくはそれに関連する細胞因子が HIV-1 cDNA の細胞質から核内への輸送過程において重要な役割を果たしていることが判った。さらに、cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを用いた HIV-1 感染抵抗性付与遺伝子の探索研究から、4 回膜貫通蛋白質のひとつである CD63 分子の N 末端細胞外ドメインを欠損する変異体蛋白質 (CD63dN) は CXCR4 の細胞膜へ移行阻害活性があり、その結果、HIV の感染を強力に抑制していることが判明した。一方、CD63 分子そのものとさらに C 末端の lysosomal sorting motif を欠損する変異体 (CD63dL) は、細胞内において HIV Env 蛋白質と結合し、Env 蛋白質のウイルス粒子内への取り込みを阻害し、細胞外に産生されるウイルス粒子の感染性を強力に抑制することが判明した。これらの事実は新規細胞性因子が HIV-1 感染過程に関わるという新たな知見であり、新たなエイズ発症阻止の治療法開発への手がかりとなることが期待される。

A. 研究目的

HIV 感染を阻害し、エイズの発症を抑制する基盤になる技術を開発し、新規のエイズ治療法として創生することを目的とする。HIV 感染増殖はウイルス性因子だけによって成立しているのではなく、種々の細胞性因子が関与している。それらウイルス感染関連因子として抑制的に働くものがあることはよく知られている。そこで、まず、核膜孔複合体構成蛋白質を主体とした新たな視点からの HIV-1 cDNA の核内移行メカニズムの解明を試みた。その結果、Nup98 という核膜孔構成分子が HIV-1 cDNA の核内移行に関わることが明らかになった。さらに、細胞性因子として新たにウイルス感染を抑制する因子群の単離を試みた

結果、cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを利用して、HIV 感染抵抗性遺伝子探索をはじめた。その結果、細胞内エンドゾームに局在する 4 回膜貫通蛋白質群のひとつである CD63 分子は HIV 感染を抑制することがわかった。そこで、その感染抑制メカニズムの解明を目的とした。

B. 研究方法

1) 細胞培養

ヒト胎児腎臓由来の 293T 細胞と CD4 と CCR5 強制発現 HeLa 細胞 (Magic5A) は、10% ウシ胎仔血清 (FCS) 含 D-MEM にて、CD4 陽性 CXCR4 陽性のヒト T 細胞である MT-4 と MT-2 細胞は 10% FCS 含 RPMI1640 にて培養を行った。

2) Real-Time PCRによるウイルス DNA の定量法

完全長 c DNA 及び 1-LTR 環状 c DNA、2-LTR 環状 c DNA、細胞染色体にインテグレーションした c DNA をそれぞれに特異的なプライマーを用いて定量した。Integrated form は、ヒトの遺伝子上に一定の間隔で存在すると言われる Alu 配列と HIV-1 の LTR 領域それぞれに特異的なプライマーを用いた 1st PCR 産物を 1000 倍に希釈したものに對して、HIV-1 の LTR 領域特異的なプライマーを用いて定量した。細胞の DNA 量を β アクチン特異的なプライマーを用いて定量することにより、細胞当たり存在する HIV-1 cDNA 量を算出した。

3) 細胞周期の解析

G1-S 期停止誘導薬剤として DNA ポリメラーゼ α 阻害剤の Aphidicolin ($5\mu\text{g/ml}$) を用いた。aphidicolin 24 時間処理後、ウイルスベクターを感染させ、さらに 24 時間後に核酸を抽出し、Real-Time PCR 法にて HIV cDNA を定量した。細胞周期は PI(propidium iodide)で染色した細胞核の DNA 含有量を flow cytometry にて解析した。

4) プラスミド DNA の構築

用いた RNAi 法は、RNA ポリメラーゼ III である U6 プロモーターにより転写されたステムループ構造を形成する small interfering RNA (siRNA) 前駆体から 21nt の 2 本鎖 RNA を発現する。U6 プロモーター下流の BfuAI 領域に以下のオリゴヌクレオチドを挿入した。siRNA である 21nt の配列選択基準は、目的の遺伝子配列から AAGN20 の配列を探し、さらに他の mRNA の配列と重複しない配列の G から始まる 21nt の領域を選択した。また、プラスミド DNA の調整中に生じる塩基の変異を防ぐため、siRNA のセンス鎖に相当する配列中の C を T に塩基変異した。

siN107

5' -CACCGATGTAA 7TAT 7AGTGTGTTGTTAGAATTACATCAA
GGGAGATAACAGCACTGATAGTTACATCTTTTATGC-3' ;

siN214

5' -CACCGATAGAAA 7AG 7TGTA 7TCTAGAATTACATCAA
GGGAGATGAAGTCACAGCTGTTTCTATCTTTTATGC-3' ;

siP62

5' -CACCGCT 7AACTTGAG 7AACA 7AGCTAGAATTACATCAA
GGGAGATGCTGTGTTGCTCAAGTTGAGCTTTTATGC -3' ;

siN98

5' -CACCGAATATGAAAG 7AAGT 7A 7TATAGAATTACATCAA
GGGAGATTAGTGACTTGCTTTTCATATTCTTTTATGC-3' ;

siN98-2

5' -CACCGTAGTTGT 7TA 7TTAGATGATTAGAATTACATCAAGGGA
GATATCATCTAAGTAGACAACACTCTTTTATGC-3' ;

siLuc 5' -CACCGTGCG 7TG 7TGGTG 7TAA 7CCATCTCCCTTGATGT
AATTCATAGGGTTGGCACCAGCAGCGCACTTTTATGC-3'

太字部分はターゲットとなる 21 塩基の配列、イタリックは安定した siRNA 発現のために挿入した塩基変異部位、下線部はループ構造 coding 領域を示す。siRNA 発現レンチウイルスベクターは、pCS-CDF-EG-PRE の EGFP DNA フラグメントを H-2K^b DNA と AgeI と XhoI 部分にて入れ換えたことにより作製したレンチウイルスベクター DNA である、pCS-CDF-EG-H2K^b の EcoRI 領域に siRNA 発現プラスミドを組み込み作製した。

DsRed 発現レンチウイルスベクター (pCS-CDF-CR-PRE) は pCS-CDF-CG-PRE の EGFP DNA フラグメントを DsRed DNA のそれと AgeI と XhoI 部分で入れ換えて作製した。N 末端に HA-Tag を付加した Nup98 の発現プラスミド (p37R-HANup98) 及び、EGFP との融合蛋白質として vesicular stomatitis virus (VSV) (Indiana serotype, San Juan strain) Matrix (VSV M) 蛋白質を発現するプラスミド (pEGFPN3-M) は Dr. Elisa Izaurralde より分与された。

VSV M 蛋白質の 52 ~ 54 番目のアミノ酸 Asp-Thr-Tyr を Ala に置換したミュータント VSV M(D) 発現プラスミドは Quickchange site-directed mutagenesis system (Stratagene) を用いて作製した。

哺乳細胞での Nup98 蛋白質の発現には、pcDNA3.1/Zeo(+) のマルチクローニングサイトに p37R-HANup98 の開始コドンから終始コドンを含む断片を組み込んだ pcDNup98 を用いた。DsRed との融合蛋白質として大腸菌で組み換え蛋白質として発現させた NLS、U1A、rpL23a は、それぞれの DNA 断片を pDsRed1-N1 (CLONTECH) の SalI-BamHI 部分に組み込み後、さらにその SalI-NotI 断片を、pGEX-4T (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) の SalI-NotI 領域に

組み込み発現プラスミドとした。大腸菌 *E. coli* ER2566 株(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)で発現させた組み換え蛋白質は、glutathione sepharose 4 Fast Flow beads (Amersham) を用いて精製した。

5) RT-PCR

細胞から RNeasy RNA-preparation Kit (Qiagen)を用いて抽出した RNA を鋳型に、RT-PCR 反応は SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen)を用いて行った。目的の mRNA の増幅には以下のプライマーを用いた。

Nup107 (5' -AAACGCGGTAGCTAACTGCA-3' ,
5' -ACCACCAGCTGACTTTGTCTGA-3')、

Nup214 (5' -CTTGCCACGAAAACCGTGA-3' ,
5' -CAACCCGCGAGTCCTGAAAA-3')、

p62 (5' -CAGACACCGACGATTTTGCTT-3' ,
5' -TGGATGTTGTTGTGGAGGTGC-3')、

Nup98 (5' -TCTCATCCCAAAACAATGCCTT-3' ,
5' -AAACAAAGATGCCTGTCCAGCA-3')、

Nup98-2 (5' -TTATAAACTGACCCCCGCC-3' ,
5' -TTTAGCCCTTCACCCACAGGT-3')、

Nup153 (5' -TGACAATGAAGGCCAAAGTGT-3' ,
5' -TAGGAGTTGTTCCAGAGCCAAA-3')、

GAPDH の mRNA 増幅には、TaqMan GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems, Foster City., CA)のプライマーを用いた。増幅反応は 50 ng の鋳型 RNA と 10 pmol のプライマーを用い 50 μ l で反応を行った。それぞれのアニーリング温度及びサイクル数等の条件をあらかじめ検討した後、アガロースゲルで電気泳動し、鋳型 RNA に含まれる目的の mRNA 量を測定した。

6) ラムダファージ部位特異的組換え法に対応するレンチウイルスベクターの作製

CS II -EF-MCS-IRES-H2K^k の *EcoR* I 部位に GATEWAY attR Reading Frame Cassette (Invitrogen, Carlsbad, California) を挿入したレンチウイルスベクター-pEF-H2K^k-GATEWAY を作製した。

7) CD63 蛋白質全長および欠損変異体発現プラスミド DNA とレンチウイルスベクター DNA の構築

ヒト白血球の cDNA ライブラリ(Invitrogen)より、以下に記すプライマーから完全長のヒト CD63cDNA をクローニングし、CMV プロモータ

ー発現プラスミドである pCMV-SPORT6 (Invitrogen)の *EcoR* I と *Xba* I 部位に挿入し、CD63 発現プラスミド DNA (pCD63) を作製した。この DNA を *EcoR* I と *Xba* I により処理し、Litmus28 (NEB, Beverly, MA)の *EcoR* I と *Xba* I 部位に挿入した。この DNA を *EcoRI* と *Xba* I により処理し、N 末端細胞外ドメインを欠損する CD63 遺伝子 (CD63dN) を pCMV-SPORT6 の *EcoR* I と *Xba* I 部位に挿入した発現プラスミド pCD63dN を作製した。CD63cDNA 全長および変異体 cDNA 部分を、GATEWAY BP clonase 酵素ミックス(Invitrogen)を用いて BP 反応を行い、エントリーベクターである pDONR221(Invitrogen)に組換えた。そして、GATEWAY LR clonase 酵素ミックス(Invitrogen)を用いて LR 反応を行い、DESTINY ベクターである pEF-H2K^k-GATEWAY に組換え、それぞれの発現レンチウイルスベクター DNA を作製した。

8) ウイルスの調整

293T 細胞に pNL-EGFP をリン酸カルシウム法にて遺伝子導入した 3 日目の培養上清をフィルターでろ過し、ウイルス溶液として -80℃ に保存した。培養上清中のウイルス量は、p24^{agg} 抗原量を酵素免疫測定法にて測定し (ZetoMetrix Corp.)、10% FCS を含 RPMI-1640 で培養したヒト細胞に対して感染を行った。VSV-G 蛋白質をシュードタイプしたウイルスベクターは、pCS-CDF-CG-PRE (EGFP 発現ベクター)、pCS-CDF-CR-PRE (DsRed 発現ベクター)、もしくは pCS-CDF-EG-H2K^k (H2K^k、siRNA 発現ベクター)を VSV の G 蛋白発現プラスミド (pVSV-G)、HIV-Gag-Pol 発現パッケージングプラスミド (pRRE)、Rev 発現プラスミド (pRSV-Rev)とともに 293T 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、3 日目の培養上清をフィルターでろ過し作製した。ウイルス力価は EGFP もしくは H-2K^k を発現した感染細胞をフローサイトメトリーで測定し、決定した。PCR にて定量を行う感染実験には 10 mM MgCl₂ の存在下で DNaseI (20 μ g/ml) を室温、30 分処理し、プラスミド DNA を取り除いたものを使用した。また、65℃で 30 分処理したものを陰性コントロールとして使用した。

9) 免疫染色

HeLa 細胞を 4% paraformaldehyde (PFA)を用い固定した。温風乾燥後、0.2% Triton X-100/PBS で 5 分間処理し細胞膜を破壊し、5% BSA/0.1% Triton X/PBS にて 1 時間ブロッッキングを行った後、核膜孔複合体を認識するマウスモノクローナル抗体(mAb414)と一昼夜反応させた。Alexa594 標識抗マウス IgG ヤギ抗体(Molecular Probes)で室温、1 時間反応させ、Leica QFluoro system にて観察した。

10) Nuclear import assay

HeLa 細胞を 50 μ g/ml Digitonin (SIGMA)/transport buffer buffer (20 mM Hepes-NaOH [pH 7.3], 110 mM CH_3COOK , 2 mM $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$, 5 mM CH_3COONa , 2 mM DTT) で 5 分処理し、細胞膜に穴を開けた。transport buffer で 3 回洗浄した後、energy-regenerating system (1mM ATP, 1mM GTP, 10mM creatine phosphate, 20U/ml creatine phosphokinase)、3 μ M DsRed 融合蛋白質 (DsRed-NLS, M9、U1A, rpL23a)、HeLa 細胞の細胞質分画と 30℃、30 分反応させた。細胞を transport buffer で洗浄後、氷上で 30 分間 1%formalin/transport buffer で固定し、Leica QFluoro system にて観察した。

11) Western blotting ならびに IP-Western blotting

細胞を RIPA buffer (0.05M Tris-HCl pH 7.2、0.15M NaCl、0.1% SDS、1% Deoxycholate、1mM Phenyl methylsulfonyl fluoride) で融解し SDS-PAGE にて泳動した。泳動後、PVDF メンブラン (Millipore corporation, Bedford, MA) に蛋白質をトランスファーした。NUP98 の検出には、一次抗体に抗 NUP98 ヤギ抗体(C-16; Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, California)、二次抗体に Biotin c 標識抗ウサギ抗体 (CHEMICON) を反応させ、最後に Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (ZYMED) にて検出した。HIV-1Env、あるいは、HIV-1Gag の検出には、一次抗体として抗 HIV-1Env ラットモノクローナル抗体 (mAb) (W#10, 琉球大学田中勇悦博士より供与)、あるいは抗 HIV-1Gag ヤギ抗体 (pAb) (Virostat, Portland, MA) を、二次抗

体として Horse radish peroxidase 標識、抗ラット IgG ロバ抗体(Rockland, Gilbertsville, PA)、あるいは抗ヤギ IgG ロバ抗体 (Chemicon, Temecula, CA) を反応させ、HIVEnv ならびに HIVGag を検出した。IP-Western blotting には、細胞を RIPA buffer により溶解し、抗 Flag 抗体 (M2; Sigma- Aldrich, Saint Louis, MO) と protein G-Sepharose (Amersham) を用いて免疫沈降させ、泳動後、PVDF メンブランに蛋白質をトランスファーした。一次抗体として抗 Env ラット mAb 抗体、二次抗体の反応以降上述の方法に従った。

12) フローサイトメトリー解析

細胞膜表面上の CXCR4 分子の検出は、一次抗体に抗 CXCR4 ラット抗体 (mAb)(A-80、琉球大学田中勇悦博士より分与された)、二次抗体として Fluorescent isothiocyanate(FITC)標識の抗ラット IgG ヤギ抗体 (American Qualex Antibodies, San Clemente, CA) を用いた。CD4 の検出には phycoerythrin (PE) 標識のマウス抗 CD4mAb (DAKO, Glostrup, Denmark)、CCR5 は PE 標識のマウス抗 CCR5mAb (Pharmingen, San Jose, CA)、CD71 は FITC 標識の抗 CD71 マウス mAb(Immunotech, Marseille, France)を用い、フローサイトメトリーにて測定した。H2K^kと二重染色を行う場合は、CXCR4、CD71、CD25 は FITC 標識抗体により染色し、H2K^k 抗原は PE 標識抗 H2K^k抗体 (CEDARLANE) を用いて、一方、CCR5 と CD4 は PE 標識抗体により染色し、FITC 標識抗 H2K^k抗体 (CEDARLANE) を用いて検出した。

13) 一過性発現プラスミドの作製

CMV プロモーターにより全長 CD63 蛋白質 (CD63wt; Met¹-Met²³⁸)、および、N 末端領域欠損 CD63 変異体蛋白質 (CD63dN; Met⁶³-Met²³⁸)、ならびに、N 末端領域 CD63 発現 (CD63N; Met¹-Leu⁶²)そして、lysosomal sorting motif (Ser²³³-Met²³⁸) 欠損 CD63C 末端欠損変異体 (CD63dL; Met¹-Arg²³²) を一過性に発現するプラスミド、pCD63wt, pCD63dN, pCD63dL, pCD63N を作製した。CD63wt, CD63dN, そして CD63dL 各蛋白質の N 末端に Flag タグを挿入した pFlagCD63wt, pFlagCD63dN, pFlagCD63N,

pFlagCD63dL を作製した。SR α プロモーターにより CXCR4 を発現する pCXCR4 ならびに C 末端領域に hrGFP ならびに EGFP 配列を挿入した pCXCR4hrGFP と pCXCR4EGFP を作製した。また、pCXCR4 の C 末端細胞内領域 (Ser³⁴⁷-Ser³⁵²) に部位特異的遺伝子変異を導入した変異体プラスミドを作製した。

14) 統計処理

2 群の比較にはウェルチの *t* 検定を行なった。P 値が 0.05 以下のものについて統計学的に有意な差があるものとした。

(倫理面への配慮)

本研究においてはすべて樹立培養細胞を用いており、その使用にあたり細胞樹立者により倫理的配慮はなされている。実験動物は使用していない。

C. 研究結果

1) G1/S 期の細胞への HIV-1 の感染

HIV-1 は、他のレトロウイルスとは異なり、静止期リンパ球やマクロファージに感染することができる。この現象は非分裂細胞において、核膜孔を通過し宿主クロマチンにウイルスゲノムをインテグレートさせることができるためである。そこで、細胞周期を停止させ、核膜が存在する条件下において感染がどの程度成立し、染色体へウイルス cDNA がインテグレートされているかどうかを Real-time PCR 法を用いて検討した。DNA polymerase α の阻害剤である aphidicolin 処理した細胞を PI で染色し、DNA 量をフローサイトメトリーで解析したところ、未処理のものに比べ S 期の細胞の割合は減少しており、G₂ 期の細胞はまったく検出されず、76.48% の細胞が G₁ 期で停止していることが確認された (図 1A)。この条件下においてウイルスベクターを感染させ、24 時間後の細胞内ウイルス cDNA 量を real-time PCR 法で定量した。図 1B は aphidicolin 存在下、非存在下における、ウイルス感染後 24 時間の培養細胞内に存在する integrated form、2LTR form、full-length/1 LTR circle form のコピー数を示した。その結果、分裂細胞に比べ少ないものの、細胞周期が停止した細胞においても十分な

integrated form が検出された。また、aphidicolin 存在下、非存在下において full-length/1 LTR circle form と integrated form の存在比はそれぞれ $10.8 \pm 2.4\%$ と $9.0 \pm 1.1\%$ 、full-length/1 LTR circle form と 2LTR form の存在比はそれぞれ $2.2 \pm 0.2\%$ と $3.1 \pm 0.1\%$ 、と有意な差は見られなかった。この結果は細胞周期が停止した状態でも HIV-1 は十分に感染を成立させることができるといふ、これまでの知見と一致しており、HIV-1 cDNA の核内移行は、MLV のような分裂期の消失時に行われる機構とは基本的に異なり、核膜孔を通過することにより核内に侵入すること強く示唆する。

2) HIV cDNA の核内移行に必須な核膜孔複合体の検索

核膜孔複合体は約 50 種もの nucleoporin の集合体であり、核内と細胞質をつなぐ唯一の経路である。近年までの分子の核内ならびに核外移行の解析は、主に電子顕微鏡による nucleoporin の局在の解析や、特異的抗体を用いた免疫染色、及びマイクロインジェクション法を用いたカエルの卵細胞の解析などが主流であったが、siRNA 法が確立されて以来、核膜孔複合体の解析に応用され、今までの解析法では得られなかった新たな知見が得られてきている。そこで、HIV-1 の感染に必須の役割を担う nucleoporin の検索に siRNA 法を導入した。nucleoporin の中でも、特に重要な役割を持つと考えられる Nup107、Nup214、p62、Nup98 の発現抑制を行ない、ウイルス感染に影響を及ぼす分子の検索を試みた。HIV-1 の感受性細胞である CD4⁺ MT-2 細胞に高効率で siRNA を導入するために、siRNA 発現ウイルスベクターを作製した。HIV-1 由来のウイルスベクターに、U6 プロモーターから siRNA を、Elongation factor から H-2K^b を発現するユニットを並列に組み込むことにより、siRNA 導入細胞を H-2K^b 発現により確認可能なウイルスベクターを作製した。Nup107、Nup214、p62、Nup98 に対する siRNA (siN107、siN214、sip62、siN98、siN98-2) 発現ウイルスベクターを MOI 3~5 で細胞に感染させ、4 日後の mRNA 発現量を RT-PCR により確認したところ、

siN107、siN214、siN98、siN98-2 導入細胞において明らかな mRNA 発現抑制が確認されたが、sip62 導入細胞ではその抑制効率はわずかであった (図 2A)。この条件下において EGFP 発現ウイルスベクターを感染させ、Nucleoporin 発現抑制条件下におけるウイルス感染効率を FACS により解析した。図 2B に EGFP 発現ウイルスベクター感染 3 日後の、H-2K^b 発現細胞における GFP 発現細胞の割合を示した。Nup107、Nup214 発現抑制細胞において軽度の感染阻害効果が確認され (88.7%、91.3%)、また、その分子の mRNA 発現抑制効率が最も低かった p62 においては、ウイルス感染抑制効果はほとんど確認されなかった (95.2%)。一方、ふたつの siRNA の標的配列によりその抑制効果は異なっているながらも、いずれの Nup98 発現抑制細胞においても明らかな HIV-1 感染の抑制効果が確認された (78.1%、84.5%)。さらに、これらそれぞれの Nucleoporin に対する siRNA 発現ウイルスベクターの感染価を MOI 10 にて行っても、同様なウイルス感染抑制効果が確認された (結果示さず)。

3) siRNA を用いた核膜孔複合体形成の阻害

以上のスクリーニングにおいて最も強い HIV-1 感染抑制効果が見られた Nup98 は、これまで mRNA の核外輸送とともに Importin β 2 を介する蛋白質の核内移行に関与する分子として知られている。また、核膜孔複合体は数種のサブコンプレックスが集合して構成されており、その中で特に Nup107 などの細胞周期 M 期終了後の核膜孔複合体再構築過程において中心的役割を有する nucleoporin の発現を阻害することにより、核膜孔複合体の構築が不完全となることが最近の研究で明らかとなっているが、Nup98 もまた核膜孔複合体再構築に関与する主要な分子であるという報告もされている。このように Nup98 は核膜孔複合体の再構築ならびに核内および核外輸送に関与する分子である。そこで、siRNA にて Nup98 発現抑制させた細胞の核膜について詳細に解析を行った。最も強力な抑制効率を有する Nup98 に対する siRNA 発現 DNA (siN98) を 293T 細胞にリン酸カルシウム法にて遺伝子導入し、72 時間後の mRNA 発現量を RT-PCR により確認した (図 3A)。

siN98 導入細胞において p62、Nup107、Nup153、Nup214 の mRNA 発現量に変化は見られなかったが、Nup98 と同程度の Nup96-mRNA の発現抑制が見られた。この結果は、Nup96 が Nup98 と同じ mRNA から前駆体が翻訳された後に、蛋白質分解酵素により Nup98 と Nup96 切断されるからである。このように siN98 による特異な mRNA 発現抑制が確認された。siN98 の mRNA 発現抑制効果は、siN98 導入後 2 日目に観察され、4 日目に抑制効果のピークがみられた。そこで、siN98 導入後 4 日目における Nup98 蛋白質の発現を Western blot により確認した (図 3B)。siN98 と Nup98 発現プラスミドを共導入した細胞において Nup98 発現ベクターからの Nup98 蛋白質の発現抑制が確認され (レーン 1, 2, 3, 4)、またそれら細胞における Nup98 蛋白質の発現量は内在性 Nup98 蛋白質のそれより低下していた (レーン 2, 3, 4, 6)。つまり、siN98 導入により強制発現および内在性の Nup98 蛋白質の発現抑制が確認された。さらに、siN98 導入細胞の核膜孔複合体の状態を、核膜孔複合体に対する特異的抗体である mAb414 を用いた Western blot 及び免疫染色により解析した (図 3C-a, b)。この mAb414 は FG リピードドメインに対する抗体であり、Nucleoporin の中でも主に p62 に、また、それより反応性は低いながら Nup153、Nup214、Nup358 に結合する抗体である。Nup107 の発現抑制により核膜孔複合体の形成を阻害すると、mRNA の発現量が変わらなくとも Nup214 や Nup153 といった他の nucleoporin 蛋白質の発現量が減少するという報告がなされている。これと同じように、siN98 導入細胞において核膜孔構成蛋白質の Nucleoporin 蛋白質の発現が抑制されているかどうかを、mAb414 を用いた Western blot により確認した (図 3C-a)。siN98 導入細胞において mRNA の発現量は変化していないにもかかわらず (図 3A)、mAb414 に反応する Nup214 及び Nup358 蛋白質の発現が抑制されていた。また、トランスフェクション法にて siN98 発現プラスミドを導入後、72 時間の HeLa 細胞を mAb414 にて染色したところ、コントロールにくらべ核膜縁のシグナルが明らかに弱く、また細胞質に強い顆粒状のシグナルが検出されるように

なった (図 3C-b)。これは Nup98 ノックアウトマウスの細胞において、核膜孔複合体の構築が一部阻害され、いくつかの nucleoporin は細胞質の Annulate Lamellae に蓄積するという報告と類似する結果であった。次に大腸菌にて DsRed 標識した NLS、U1A、rpL23a 蛋白質を作製し in vitro nuclear import assay にて、Nup98 発現抑制細胞核膜の核内輸送機能を検討した (図 3D, 3E)。DsRed 標識した NLS、U1A、rpL23a を用いて in vitro nuclear import assay を行い、その細胞を固定後、Leica Qfluoro System にて観察した (図 3D)。また、ランダムな 5 視野における核内シグナル陽性細胞の割合を示した (図 3E)。その際、細胞により核内シグナルに強弱が見られた。そこで陽性細胞のカウントを正確に行うために、Leica Qfluoro によるシグナルの取り込み時間を 2 秒に統一して、その後バックグラウンドが消えるまでコントラストを上げることにより、陽性、陰性を明確にしてカウントした。受動拡散による核内移行を行う U1A 蛋白質の核内移行は、コントロールの luciferase-siRNA 導入細胞において $60.8 \pm 14.8\%$ 、Nup98-siRNA 発現細胞では $58.4 \pm 8.7\%$ とその差はみられなかった。これは核膜孔複合体が存在することを強く示唆する。また、importin β 、transportin(importin $\beta 2$)、importin $\beta 3$ 、importin7 の 4 種類の輸送担体蛋白質と直接結合し、いずれかの核内輸送経路にて核内へ移行する rpL23a 蛋白質の核内移行も、luciferase-siRNA 導入細胞において $54.7 \pm 10.7\%$ 、Nup98-siRNA 導入細胞では $58.5 \pm 11.5\%$ とその差はみられなかったが、importin α / β の経路にて核内に移行する NLS の核内移行能は Nup98-siRNA 導入により $87.5 \pm 7.6\%$ から $71.6 \pm 11.0\%$ と有意に低下した (図 3E)。このことから Nup98 の siRNA 導入により、核膜孔複合体のすべての構造が破壊されたのではなく、一部の nucleoporin の構造を機能特異的に阻害されていることが示された。

4) Nup98 発現抑制細胞への HIV-1 の感染性

次に、siN98 の導入により核膜孔複合体が部分的に機能欠損に至った細胞における HIV-1 cDNA の核内移行能を Real-time PCR 法にて検討した。

siRNA 発現プラスミドをリン酸カルシウム法にてトランスフェクション後 7 2 時間の 293T 細胞に、レトロウイルスベクターを約 MOI 0.5 で感染させ、さらに 2 4 時間後に DNA を抽出し、HIV-1 cDNA 量を Real-time PCR にて定量した。siN98 発現細胞における full-length DNA 量は、コントロールの luciferase-siRNA (siLuc) 発現細胞との間に有意な差が見られなかった (図 4A、 1×10^6 細胞あたりそれぞれ 619047 ± 71648 copies と 661023 ± 121470 copies、ウェルチの t 検定 $P > 0.05$) が、integrated form と 2LTR form の形成には有意な抑制効果が見られた (integrated form: 1×10^6 細胞あたりそれぞれ 35181 ± 5524 copies と 75832 ± 17646 copies、ウェルチの t 検定 $P < 0.05$; 2LTR form: 1×10^6 細胞あたりそれぞれ 36938 ± 6621 copies と 52740 ± 7761 copies、スチューデントの t 検定 $P < 0.05$)。また、full-length DNA/1LTR と integrated form 及び 2LTR form の存在比は siN98 発現細胞で $11.6 \pm 0.7\%$ 、siLuc 発現細胞で $19.6 \pm 2.5\%$ と、Nup98 発現抑制細胞では、HIV-1 cDNA の核内移行が抑制されていた。

次に、実際に複製可能な HIV-1 感染において、Nup98 が重要な働きを担っているかどうかを検討した。siRNA 発現レンチウイルスベクター感染後 3 日目の MT-2 細胞へ EGFP を発現する複製可能な HIV-1 を MOI 0.2 にて感染させた。HIV-1 感染後 3 日目において、EGFP を発現した発現細胞 (= ウイルス感染細胞) は、コントロールの siLuc 導入 MT-2 で 56.3% であったのに対し、siN98 導入 MT-2 細胞では 32.8% であった (図 4B)。蛍光顕微鏡でも EGFP 発現抑制が観察された。 (図 4C)。また、感染後 3 日後と 7 日後の p24 発現量も siLuc 導入細胞に比べ $1/4 \sim 1/10$ 程度に減少した。

5) Nup98 の機能を特異的に阻害する VSV-M 蛋白質による HIV-1 の感染阻害

siRNA 導入 Nup98 発現抑制により HIV-1 の感染が抑制されたが、この siN98 導入細胞においては、図 3A に見られるように Nup96 RNA 分子の発現の抑制もみられる。Nup96 は Nuo107 サブコンプレックスの構成蛋白質のひとつでもあり、Nup98 が直接関与する核内移行抑制による感染阻害であるのか、Nup98 並びに Nup96 の発現抑制に付随する

核膜孔複合体再構築の阻害による2次的な阻害(他のNupが核膜孔複合体に集合できなかったため)であるのか明らかにする必要がある。そこで、Nup98がHIV-1 cDNAの核内移行に直接関与するかどうかを確認するため、Nup98の特異的な阻害作用を有するVSV-M蛋白質を用いた実験を行った。VSV-M蛋白質はNup98の66-515アミノ酸部位のFG-repeatドメインに結合することにより、hRAE1/Gle2やTAP、CRM1といった輸送担体との結合を阻害し、蛋白質の核内移行、並びにmRNAの核外移行を特異的に阻害する分子として報告されている。一方、VSV-M蛋白質の抑制効果は52-54アミノ酸をアラニンに置換した変異蛋白質M(D)において見られない。そこで、野生型VSV-M蛋白質発現プラスミドDNA及び変異型VSV-M(D)蛋白質発現プラスミドDNAを導入した293T細胞へウイルスベクターを感染させ、24時間後のウイルスcDNA量をReal-Time PCR法にて定量し、そのHIV-1 cDNAの核内移行阻害効果を検討した。Nup98-siRNA発現細胞の結果と同様、VSV-M発現細胞においてfull-length DNAの形成はコントロールとその差は見られなかった(図5A、 1×10^6 細胞あたりpUC: 1996211 ± 600128 copiesとM: 2368567 ± 221759 copies)が、integrated formと2LTR formの形成には有意な抑制効果が見られた(1×10^6 細胞あたりintegrated、pUC: 136217 ± 37708 copiesとM: 56128 ± 8144 copies; 2LTR、pUC: 206444 ± 23076 copiesとM: 147559 ± 5423 copies)。この抑制効果は変異蛋白質のVSV-M(D)発現細胞では確認されなかった。

また、本実験で用いたVSV-M蛋白質はEGFPとの融合蛋白質として発現するため、VSV-M発現細胞にDsRed発現HIVベクターを感染させ、VSV-M蛋白質発現細胞におけるHIV-1の感染阻害効果をFACSにより解析したところ、VSV-M発現細胞においてウイルス感染の抑制がみられた(図5B、GFP⁺、DsRed⁺細胞、M: 3.9%とM(D): 20.9%)。以上の結果より、Nup98が直接HIV cDNAの核内移行に関与していることが示された。

以上の結果はNup98がHIV cDNAの核内移行にきわめて重要な働きを担っていることを示すものである。

6) cDNAライブラリ発現レンチウイルスベクターによるHIV-1抑制因子の同定

次に我々は、ゲノムレベルによる探索研究のためにヒト白血球由来cDNAライブラリ発現レンチウイルスベクターによるHIV抵抗遺伝子のスクリーニング実験系を確立した(図6A)。そして、まず、GPIアンカー膜蛋白質であるCD14がウイルスのエントリーを阻害すること(図6B)、そして、細胞内エンドゾームに局在する4回膜貫通蛋白質群のひとつであるCD63分子のN末端欠損変異体蛋白質をコードするCD63dN遺伝子もHIV-1抑制遺伝子であると示された(図6C)。このCD63dN遺伝子導入によりHIVの感染性は本当に抑制されるのかを確認するために感染実験を行った。HIV-1標的細胞として、ヒトCD4⁺MT-4あるいはHeLa細胞由来のCD4とCCR5が強制発現されているMagic5A細胞を用いた。いずれの細胞においてもCD63dN遺伝子導入により、非導入(untransduced)あるいはコントロールベクター(empty vector)に比べ、その培養上清中のHIV抗原量(gag^{p24})は約100分の1ほどに抑えられていた(図7A)。そして、感染細胞のPCR解析よりその抑制はエントリーの段階であることが判明した(図7B)。すなわち、HIV-1の増殖性はこの遺伝子により強力に抑制されていることがわかった。このHIV-1感染抑制はX4ウイルスの場合のみであり、R5ウイルスであるJRCSFの感染性はほとんど影響を受けなかった(図7A)。そこで、X4ウイルス特異的な分子の発現あるいは機能が、このCD63dN遺伝子導入により影響を受けている可能性があることが想像された。実際、このレンチウイルスにより遺伝子が導入された細胞は遺伝子導入効果依存的に、X4ウイルスが特異的にコレセプターとして使うCXCR4の発現を抑制することが分かった(図8A, B, C)。一方、他の分子はR5ウイルスがコレセプターとして使うCCR5分子、HIVの第一のレセプターであるCD4、そして、細胞膜からエンドサイトーシスされ、主に再利用されて細胞膜に発現するトランスフェリンレセプター(CD71)の発現はほとんど影響を受けなかった(図8A)。この発現抑制は遺伝子発現レベルの抑制か、あるいは、CXCR4分

子の細胞表面からのダウンレギュレーションなのかを明らかにするために、細胞内蛋白質発現量を western blotting により測定してみた。その結果、CD63dN の導入細胞もほとんどに同じレベルの蛋白質を保持していることがわかった (図 8D)。実際、CD63dN 遺伝子を導入した細胞においては、蛍光抗体法により CXCR4 分子は細胞質内に多く集積していたこともわかっている (結果示さず)。さらに、欠損変異体ではない CD63 そのものを遺伝子導入した細胞においても、その活性は CD63dN の活性と比較して弱いながら、CXCR4 の細胞膜上の発現は抑制されることも見出している (結果示さず)。すなわち、CXCR4 蛋白質は細胞内に存在しているが、細胞膜上への移行が阻害されていることが示唆された。そこで、この CD63 分子による CXCR4 細胞膜上へ発現抑制はどのようなメカニズムによるものか検討する細胞生物学的実験を始めた。すなわち、CD63dN 遺伝子導入 Magic5A 細胞内の CXCR4 の分布を細胞科学的に解明するために、細胞内小器官マーカー分子 (ER, ERGIC, cisGolgi, trans-Golgi, early endosome, late endosome) に対するそれぞれの抗体を用いて蛍光 2 重染色法を行った。その結果、CD63dN 導入細胞内の CXCR4 は ER, ERGIC, cisGolgi, trans-Golgi、そして、late endosome とは部分的に共局在はするものの、early endosome マーカーとはまったく共局在はしなかった (結果示さず)。この事実は CXCR4 が細胞内小器官の特に特定の小器官に貯留しているのではなく、細胞膜とそれに続く early endosome への細胞内移行が阻害されていることが強く示唆された (図 10B 参照)。

7) CD63dN による CXCR4 分子の細胞膜上への移行阻害

細胞内における CXCR4 分子の移動を経時的に解析するために、CXCR4 のタグ分子として hrGFP あるいは EGFP 分子を付加し、共焦点顕微鏡にて生細胞内における挙動を解析した。その結果、図 9 に示すようにトランスフェクション後、7 時間目まで追跡しても CXCR4 は細胞内に局在し、細胞膜上には移行しないことがわかった。また、抗体分子の endocytosis を阻害するために cytocharasin D を処理した細胞を FITC 標識抗 CXCR4 抗体存

在下に 2 時間以上培養し、その蛍光色素の分布により生細胞における CXCR4 の細胞膜上における発現を検討すると、CD63dN 遺伝子導入細胞ではまったく CXCR4 が検出できず (結果示さず)、CD63dN 遺伝子導入により細胞膜上への CXCR4 の移行は少なくとも培養期間内において抑制されていることがわかった (図 10B)。次に、CXCR4 細胞膜移行抑制効果が、CXCR4 のどのようなドメインを認識しているか明らかにするために、まず、この細胞膜移行抑制効果が、CD63dN 発現プラスミド DNA と CXCR4 発現プラスミド DNA のコトランスフェクションによっても再現できるか検討した。その結果、CD63dN 発現レンチウイルスベクターによって導入された細胞と同じ効果がこれらのプラスミドをコトランスフェクションした 293T 細胞においても見出されることがわかった (結果示さず)。この実験系を用いて、CXCR4 のどのようなドメインがこの抑制効果に必要なか検討した。その結果、CXCR4 の細胞内 C 末端のドメイン (Ser³⁴⁷SerPheHisSerSer³⁵²) にそれぞれアミノ酸置換を挿入した発現プラスミドと CD63dN 発現プラスミドのコトランスフェクション後、CXCR4 の細胞膜上の発現を検討したところ、CXCR4 の Ser³⁴⁸ と Ser³⁵² アミノ酸配列が重要であることがわかった (図 10)。

8) HIV 粒子産生抑制メカニズムの解析

これらの CD63 分子の一連の実験から、さらに新しい事実がわかってきた。CD63 分子そのものと、さらに C 末端の lysosomal sorting motif を欠損する変異体 (CD63dL) 発現プラスミドはウイルス産生に対して影響を及ぼすことが判明した。まず、CD63、あるいは、CD63dL 発現ベクターを 293T 細胞に一過性に導入し、同時に感染性 HIV 粒子を放出させることができるプラスミド (pNL4-3) をコトランスフェクションし、その効果を判定した (図 11A)。その結果、培養上清中の感染性 HIV-1 量が明らかに低下させられることがわかり、CD63 そのもの (CD63wt) とさらに CD63dL は、HIV のウイルス粒子放出を強力に抑制することが判明した。一方、CXCR4 発現を抑制した CD63dN にはウイルス粒子放出過程に対する影響は弱いことがわかった (図 11A, B)。CD63wt と CD63dL

は遺伝子導入によりその局在がリソソーム膜に移行せず細胞質膜にとどまること（結果示さず）、そして、この細胞質膜から放出されるウイルス粒子中の Env 蛋白質量がきわめて減少していること（図 11C）より、ウイルス粒子中へ Env 蛋白質の取り込みの阻害効果があることが判明した。そこで、Env 蛋白質と CD63 分子の細胞内における存在様式を明らかにするために、Flag 配列を付加した CD63wt 発現プラスミドと HIV-1 を産生するプラスミド(pNL4-3)を 293T 細胞にコトランスフェクションし、抗 Flag 抗体により免疫沈降した細胞分画に Env 蛋白質が取り込まれているか IP-Western blotting を行った。図 11D に示すように、CD63 は明らかに Env 蛋白質と結合していることが判明した。さらに、種々の CD63 分子変異体が同様に Env 蛋白質と結合しているか検討したところ、lysosomal sorting motif を欠損する変異体(CD63dL)と N 末端細胞外領域を発現する CD63N は明らかに、Env 蛋白質と結合していること、一方、N 末端欠損変異体である CD63dN は結合しないことを見出し、N 末端領域にその結合ドメインがあることがわかった(図 11D)。

D. 考察

HIV 感染における核膜孔構成蛋白質の役割

HIV-1 はその発見から精力的に研究され、その複製機構の概要が明らかになってきているが、AIDS 患者が世界的に増え続けている現在、その広がり終止符を打つに至るまでの知見は得られていない。現在の薬剤はウイルスレセプターや逆転写をターゲットとするのが AIDS 治療の主体となっているが、HIV-1 感染の機構の中でも核内移行のメカニズムの解明は、AIDS 治療に多大に貢献する分野であると考えられる。

HIV をはじめとするレトロウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルスなどは核内で自己ゲノムの複製を行うため、ウイルスゲノムを核内に輸送する。このウイルスゲノムの核内移行メカニズムの解明は、ウイルス感染の制御、及び、新たな治療方法の開発に発展するものとして、近年様々なメカニズムが明らかになりつつある。中でもアデノウイルスの核内移

行経路の解明は大きく注目されている。アデノウイルスは細胞内に侵入後、核膜孔複合体の細胞質側に位置する CAN/Nup214 にウイルスカプシドを結合させる。次いでヒストン H1 がカプシドを形成するヘキソンに結合し、ヘキソンはヒストン H1 蛋白質とともに Importin7、Importin β により核内に輸送されるため、カプシドが崩壊する。その結果、ウイルス DNA を核内に放出させると報告されている。この論文はウイルス感染過程に核膜孔複合体の関与が明らかになった報告であり話題となった。HIV に関してもごく最近、HIV cDNA の核内移行にヒストン H1 や、rpL23a の輸送担体として知られる importin7 が関与するという報告がされた。この論文では、PIC を構成する蛋白質を単独に解析したのではなく、PIC そのものを抽出して解析しているため非常に興味深い結果であり信憑性があると考ええる。

我々の結果によると siRNA を用い Nup98 の発現を抑制した細胞において NLS の核内移行経路は部分的に欠損したが、U1A、rpL23a の核内移行経路は正常であり（図 3D, E）、この細胞において HIV cDNA の核内移行の抑制が確認された（図 4A）。rpL23a は importin7 の経路を利用し核内に輸送されるが、その他にも importin β 、importin β 2、importin β 3 の経路でも核内に輸送されるので矛盾はない。Nup98 ノックアウトマウス細胞では、importin β 3 の経路は阻害されないと報告されている。また、Nup98 ノックアウト細胞において、p62 や Nup214 などの Nucleoporin は細胞質の Annulate Lamellae に凝集し、核膜孔複合体の再構築が部分的に抑制され、さらにそれに加え、importin α 、importin β 、importin β 2、importin7、CRM1 といった輸送担体もまた核膜ではなく Annulate Lamellae へ凝集し、蛋白質輸送に影響を及ぼすと報告されている。そのため、Nup98 抑制細胞において rpL23a の輸送が抑制されていなくとも、HIV cDNA の核内移行に importin7 が関与するという報告との間に矛盾はない。また、図 3C に示すように、siRNA で Nup98 の発現抑制をした細胞においても Nup98 ノックアウトマウスと同様にシグナルの凝集が見られた。この凝集の程度は低いが、これは siRNA の抑制効率に由来する

と考えられ、siRNAによりNup98が発現抑制された細胞においても、この核輸送経路が部分的に崩壊していることが示唆される。このsiRNAの影響を受けた核輸送経路にHIV cDNAの核内輸送経路が含まれていると予測され、このことからHIV cDNAの核内移行にimportin7が関与していることが示唆される。

これまでの解析から、核輸送の方向性は基本的にRanGDPとRanGTPの存在密度に関係していることは明らかになっている。細胞質においてはRanGDPが多く存在し、核内においてはRanGTPが多く存在する。RanGTPはカーゴ分子(NES)/輸送担体(CRM1など)と共に複合体を形成し細胞質側のNucleoporin(CAN/Nup214という報告がある)に到達するとRanBP1の働きによりRanGTPはRanGDPへと変換されカーゴ分子(NES)は細胞質に放出される。同じくRanGDPは核内輸送されるカーゴ分子(NLS)/輸送担体(importin β)と共に複合体を形成し、核膜孔複合体を通過し、核内部のNucleoporin(importin β を介するものではNup153、importin β 2を介するものではNup98という報告がある)に結合する。そこでRCC1の働きによりRanGDPはRanGTPへと変換されるとカーゴ分子(NLS)は核内に放出されるのである。Nup98はこのRanGDP/GTP変換の際、複合体が最後に結合する足場となるという報告もされており、HIV cDNAの核内移行の際にもNup98が核内への放出に関係しているのかもしれない。

また、蛋白質が核膜孔複合体を通過する際のモデルとして、現在もっとも信じられているのは「affinity gradient」モデルである。核膜孔複合体が約50種類のNucleoporinから構成されていることは既に述べた。これらNucleoporinはそれぞれのFG及びFXFG repeatで輸送担体のimportinと結合するが、それぞれのNucleoporinとimportinの親和性が異なっているのである。例えばimportin β の核内移行の場合、その親和性がNup358<p62<Nup153となっており、その親和性の勾配により、importin β はNup358→p62→Nup153と連続的に結合していくことで核内移行するという報告もある。HIV cDNAの核内移行の際、Nup98が親和性勾配の経路のひとつである可

能性も考えられる。

さらに、本研究ではCD63分子、特にそのN末端細胞外領域を欠損した蛋白質がCXCR4の細胞膜表面への移行を阻害すること、そして、CD63そのものはEnv蛋白質と細胞内において結合し、ウイルス粒子への取り込みを阻害する結果、ウイルス感染を抑制することを明らかにした。

α ケモカインであるSDF-1の受容体CXCR4については、そのリガンドにより刺激した際の動態についての報告は数多く存在する。SDF-1のような外因性刺激を介したレセプターのダウンレギュレーション機構とは異なり、CD63分子、ならびに、その変異体分子のような内因性蛋白質の発現によるケモカインレセプターの発現減少機構についての知見はほとんどない。CXCR4のリガンド刺激後のインターナリゼーションには、デグラデーションモチーフと呼ばれるC末端のSSLKILSKGKアミノ酸が関与している。このアミノ酸配列中の3つのリシンがユビキチン化され、その結果リソソームへの移行が促され、その分子の破壊が誘導されると知られている。そして、Nedd4ファミリーのユビキチンリガーゼAIP4が、細胞膜上のCXCR4をユビキチン化し、その後、エンドソーム膜に局在するユビキチン結合蛋白質であるHrsと結合し、そして、Hrsのユビキチン化を誘導し、その結果CXCR4とHrsそしてAIP4が複合体を形成して共局在することが報告されている。しかし、AIP4によるCXCR4のユビキチン化は細胞膜上でおこなわれているが、CD63dN導入細胞におけるCXCR4は細胞膜に到達していないこと明らかになったことより、CD63dN蛋白質によるCXCR4発現抑制メカニズムは細胞膜上のCXCR4分子をユビキチン化しリソソームにおいて分解させる経路とは異なる経路と考えられる。むしろリボソームで生産された新規のCXCR4蛋白質が細胞膜に到達せず細胞内に蓄積し、リソソームにおいて破壊されているものと考えられる。CD63自体がN末端を欠損することにより、本来のCD63蛋白質が局在する部位まで到達できない可能性も考えられる。そして、CD63dN分子とCXCR4分子が共局在し、さらに結合していること(結果示さず)を考え合わせると、

新たに合成された CD63dN 蛋白質が新たにリソソームにて翻訳された CXCR4 蛋白質をおそらくトランスゴルジ体において結合し late endosome からリソソーム移行させていると考えられる。

ところで、生体内において CD63dN のような欠損変異体が発現し、これまで述べてきたような役割を担っている可能性について検討すべきである。The European Bioinformatics Institute (EBI) の Alternative Splicing Database (ASD) Project では、いくつかの CD63 の選択的スプライシング産物が報告されており、CD63dN 遺伝子よりさらに N 末端側 11 アミノ酸と C 末端から 22 アミノ酸を欠失した mRNA がヒト細胞内において発現していることが報告されている (<http://www.ebi.ac.uk/asd/>)。今後、骨髄のような、分化の過程において CXCR4 を細胞膜表面上に強発現し一過性に消失する細胞に注目し、CD63dN 遺伝子、もしくは、それに近い CD63 の変異体が生体内に存在するかを検討する必要がある。

CD63dN 分子のきわめて強力な CXCR4 発現抑制活性について述べたと同時に、CD63 分子自身に Env 蛋白質との結合により Env 蛋白質のウイルス粒子内への取り込みを阻害し、その結果、感染性 HIV 産生抑制活性があることを示した (図 11A)。CD63 分子は後期エンドソーム、および、リソソームに局在することは知られているが、その機能の詳細は不明である。これまでにメラノーマ細胞へ CD63 分子の遺伝子導入を行うとその細胞の転移能を抑制するということが知られている。また、多くの癌細胞において CD63 蛋白質の発現が低下、ないし、減少しており、CD63 を発現していないヒトメラノーマ細胞に CD63 遺伝子を強制発現させると、癌細胞の移動と運動性が低下することや、導入した CD63 を安定的に発現するメラノーマ細胞をヌードマウスに接種すると、導入してない細胞を注射した場合よりも腹腔内転移が減少したことも知られている。

CD63 は他の 4 回膜貫通蛋白質であるテトラスパニン分子 (CD9, CD53, CD82) と複合体形成することがよく知られており、これらテトラスパニン分子群は HIV 感染においてある役割を有していると考えている (図 11E)。これら細胞性膜蛋

白質分子群と HIV 分子との相関性について、今後さらに研究を進める必要がある。

E. 結論

本研究ではその核膜孔複合体の構成蛋白質の中から Nup98 が HIV cDNA の核内移行に関与することを見出した。この分子を siRNA により発現抑制することにより HIV cDNA の核内移行を阻害することができた。Nup98 を介した感染メカニズムの更なる解明は、新たな AIDS 治療法の開発に大いに貢献するものと思われる。さらに、cDNA 発現レンチウイルスベクターを利用した HIV 抑制遺伝子探索実験から、CD63 分子の発現により HIV の侵入、そして、粒子放出過程を強力に抑制しうることが判明した。これら遺伝子導入により、将来の遺伝子治療への応用の可能性だけでなく、分子機序の解明から新たなメカニズムに基づく治療薬の開発への端緒となることが考えられる。

F. 健康危険情報

HIV 増殖の抑制により、エイズ患者の発症、特に潜伏感染の抑制に寄与する情報である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miura Y, Koyanagi Y, Mizusawa H. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces neuronal apoptosis in HIV-encephalopathy. J. Med. Dental Sci. 50: 17-25, 2003.
2. Miura Y, Misawa N, Kawano Y, Okada H, Inagaki Y, Yamamoto N, Ito M, Yagita H, Okumura K, Mizusawa H, Koyanagi Y. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces neuronal death in a murine model of HIV central nervous system infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100: 2777-2782, 2003.
3. Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, Tanaka R, Hirose K, Bannai K, Edamatsu T, Yanaka M, Niitani Y, Miyano-Kurosaki N, Takaku H, Koyanagi Y, Yamamoto N. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits

- a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 4185-4190, 2003.
4. Sato Y, Terada Y, Utsunomiya H, Koyanagi Y, Ito M, Miyoshi I, Suzuki T, Sasano H, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in human follicle following xenotransplantation of the human ovarian cortex into NOD-SCID mice. *Mol. Reprod. Dev.* 65: 67-72, 2003.
 5. Zahidunnai D M, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Okayama A, Fujii M, Yamamoto N. Rapid tumor formation of hman T-cell leukemia virus type 1-infected cell line in novel NOD/SCID/ gammac(null) mice · (NOG) mice: Suppression by an inhibitor against NF-kappaB. *J. Virol.* 77: 5286-5294, 2003.
 6. Yoshida A, Tanaka R, Murakami T, Takahashi Y, Koyanagi Y, Nakamura M, Ito M, Yamamoto N, Tanaka. Induction of protective immune responses against R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in hu-PBL-SCID mice by intrasplenic immunization with HIV-1-pulsed dendritic cells: possible involvement of a novel factor of human CD4(+) T-cell origin. *J. Virol.* 77: 8719-8728, 2003.
 7. Suzuki Y, Misawa N, Sato C, Ebina H, Masuda T, Yamamoto N, Koyanagi Y. Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1 DNA dynamics by real-time PCR: Integration efficiency in stimulated and unstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virus Genes*, 27:177-188, 2003.
 8. Feng J, Misu T, Fujihara K, Misawa N, Koyanagi Y, Shiga Y, Takeda A, Sato S, Takase S, Kohnosu T, Saito H, Itoyama Y. Th1/Th2 balance and HTLV-I proviral load in HAM/TSP patients treated with interferon- · . *J. Neuroimmunol.* 51:189-194, 2004.
 9. Ebina H, Aoki J, Hatta S, Yoshida T, Koyanagi Y. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. *Microbes & Infection* 6, 715-724, 2004.
 10. Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, Shibayama S, Sagawa K, Fukushima D, Moravek J, Koyanagi Y, Mitsuya H. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-Chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J. Virol.* 78:8654-8662, 2004.
 10. Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Miyoshi H, Koyanagi Y. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death. *J. Virol.* 78:11352-11359, 2004.
 11. Kamada M, Li RY, Hashimoto M, Kakuda M, Okada H, Koyanagi Y, Ishizuka T, Yawo H. Intrinsic and spontaneous neurogenesis in the postnatal slice culture of rat hippocampus. *Eur J. Neurosci.* 20, 2499-2508, 2004.
 12. Nakata H., Maeda K., Miyakawa T., Shibayama S., Matsuo M., Takaoka Y., Ito M., Koyanagi Y, and Mitsuya H.: Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ON04128/ GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor · -chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79: 2087-2096, 2005.
 13. Miura Y., and Koyanagi Y.: Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection. *Rev. Med. Viro.* 15: 169-178, 2005.
 14. Matsuura-Sawada R., Murakami T., Ozawa Y., Nabeshima H., Akahira J., Sato Y., Koyanagi

- Y., Ito M., Terada Y., and Okamura K.: Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue. *Hum Reprod.* 20:1477-1484, 2005.
15. Ohkura S., Yamashita M., Ishida T., Babu P.G., Koyanagi Y., Yamamoto N., Miura T., and Hayami M.: Phylogenetic heterogeneity of new HTLV type 1 isolates from southern India in subgroup A. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 4:325-330, 2005.
 16. Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., Koyanagi Y., Yamamoto N., and Kawai G.: Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimers. *J. Biochem.*, 138:583-592, 2005.
 17. Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., Koyanagi Y., and Sasaki T.: Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood.* 106:3449-3456, 2005.
- ## 2. 学会発表
1. Koyanagi Y, Kawano Y, Tanaka Y., CXCR4 is a critical molecule for dissemination of HTLV-I leukemic cells in vivo. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2003.
 2. Miura Y, Koyanagi Y, Mizusawa H, Detection of a death inducing ligand in brain of HIV encephalopathy patients and induction of neuronal apoptosis in vitro and in vivo HIV infection model. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2003.
 3. 小柳義夫. レトロウイルスによる脳神経組織障害のメカニズム. 日本神経免疫学会、長崎、2003.
 4. 蝦名博貴、青木淳、小柳義夫. Nucleoporin 依存性HIV感染のメカニズム. 第51回日本ウイルス学会、京都、2003.
 5. 青木淳、小柳義夫. 抑制性 RNA 発現レンチウイルスベクターの開発. 第 51 回日本ウイルス学会、京都、2003.
 6. 青木淳、小柳義夫. HIV 感染への RNAi 発現レンチウイルスベクターの開発. 第 26 回日本分子生物学会、神戸、2003.
 7. 河野祐治、小柳義夫. A lentivirus-based expression cloning system for human T cells. 第 26 回日本分子生物学会、神戸、2003.
 8. Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Koyanagi Y. A cDNA library-expressing lentivirus vector system to identify inhibitor gene for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-induced cell death. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2004.
 9. Aoki J, Koyanagi Y. Stable inhibition of CXCR4 with siRNA-expressing lentivirus vector. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2004.
 10. 芳田剛、河野祐治、稗田訓子、青木淳、三浦義治、小柳義夫. cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターによる HIV 抑制因子の単離 第 52 回日本ウイルス学会、横浜 2004.
 11. 稗田訓子、芳田剛、青木淳、三浦義治、河野祐治、田中勇悦、小柳義夫. 生細胞における HIV コレセプター分子の解析. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
 12. 三浦義治、小柳義夫. エイズ脳症で起こる神経細胞死には TRAIL 分子が関与する. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
 13. 岡田広司 三浦義治 川口寧 西山幸廣 小柳義夫. 中枢神経組織スライス培養系を用いた単純ヘルペスウイルス 1 型の感染様式の解析. 第 52 回日本ウイルス学会、横浜、2004.
 14. Koyanagi Y, Aoki J, Yoshida T, Ebina H. Role of Nup98 in nuclear entry of human immunodeficiency virus type 1 cDNA. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004.
 15. Koyanagi Y, Kawano Y, Yoshida T, Jun Aoki. A cDNA library-expressing lentivirus vector system used to clone an inhibitor for HIV-1-induced cell death. 第 18 回日本エイズ学会、静岡、2004.
 16. 青木淳、蝦名博貴、小柳義夫. HIV 増殖関連細

- 胞因子の siRNA 発現レンチウイルスベクターによる解析. 第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.
17. 芳田剛、稗田訓子、河野祐治、青木淳、小柳義夫. ゲートウェイ法による効率的 cDNA ライブラリの組換え反応を利用した発現レンチウイルスベクター: HIV 抵抗性遺伝子の単離. 第 27 回日本分子生物学会、神戸、2004.
 18. Yoshida T, Hieda K, Kawano Y, Aoki J, Misawa N, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y, A truncated form of CD63-deletion mutant blocks X4-HIV-1 entry through dislocalization of CXCR4. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2005.
 19. Aoki J, Koyanagi Y. Suppression of HIV-1 release through CD63-overexpressed plasma membrane. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2005.
 20. 青木淳、小柳義夫. CXCR4 を標的とした siRNA 発現レンチウイルスベクターを用いた悪性腫瘍の遺伝子治療. 第 64 回日本癌学会、札幌、2005.
 21. 安藤良徳、芳田剛、小柳義夫. 生細胞における CXCR4 分子のイメージング解析. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
 22. 青木淳、佐藤佳、佐野浩一、大黒恵理子、小柳義夫. CD63 過剰発現による HIV-1 粒子の感染性抑制. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
 23. 北山裕子、三浦義治、小柳義夫. HIV 感染マクロファージによる中枢神経系未分化細胞群への障害. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
 24. 篠田康彦、稗田訓子、小柳義夫. 薬剤誘導性発現レンチウイルスベクターの開発. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
 25. 佐藤佳、青木淳、北山裕子、小柳義夫. がん細胞転移抑制性レンチウイルスベクターの開発. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
 26. 三浦義治、青木淳、北山裕子、佐野浩一、川口寧、小柳義夫. 神経幹細胞は単純ヘルペスウイルス 1 型感染細胞として重要である. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
 27. 北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫. 中枢神経組織内における抗 HSV 因子の探索. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
 28. 芳田剛、河野祐治、青木淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 抗 HIV 因子の単離: CXCR4 細胞膜移行阻害分子の同定. 第 53 回日本ウイルス学会、横浜、2005.
 29. 中田浩智、前田賢次、宮川寿一、河野祐治、柴山史郎、高岡義和、小柳義夫、満屋裕明. 第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005.
 30. 三浦義治、北山裕子、小柳義夫. HIV 脳症における中枢神経系未分化細胞群関与の検討. 第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005.
 31. 青木淳、佐藤佳、大黒恵理子、佐野浩一、小柳義夫. テトラスパニン分子による HIV-1 粒子の感染性抑制. 第 19 回日本エイズ学会、熊本、2005.
 32. 芳田剛、河野祐治、青木淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 特定の細胞膜表面分子に対する細胞膜移行阻止因子の単離: CXCR4 発現阻止因子. 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005.
 33. 星野重樹、志村まり、田口崇、小柳義夫、石坂幸人. HIV-1 潜伏感染細胞からのウイルス再産生における Vpr の機能. 第 28 回日本分子生物学会、福岡、2005.
- G. 知的所有権の出願・登録状況 (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
なし

図. 1.

G1期停止細胞におけるHIV cDNAの核内移行効率。

(A) aphidicolin処理した細胞の解析。
Aphidicolinを含む(+)培地もしくは含まない培地(-)で24時間培養したMT-2細胞をpropidium iodide (PI)でDNAを染色し、flow cytometryにて細胞内DNA含有量を解析した。

(B) HIVベクターを感染させた
Aphidicolin処理及び未処理細胞中のHIV cDNAの定量。HIVベクター感染後24時間の培養細胞中に含まれるウイルスDNAコピー数を示す。Aphidicolin処理及び未処理の細胞にHIVベクターを感染させ、Aphidicolinを含む(+)培地もしくは含まない培地(-)で24時間培養後、DNAを回収し、Real-time PCRによりウイルスDNAコピー数を定量した。

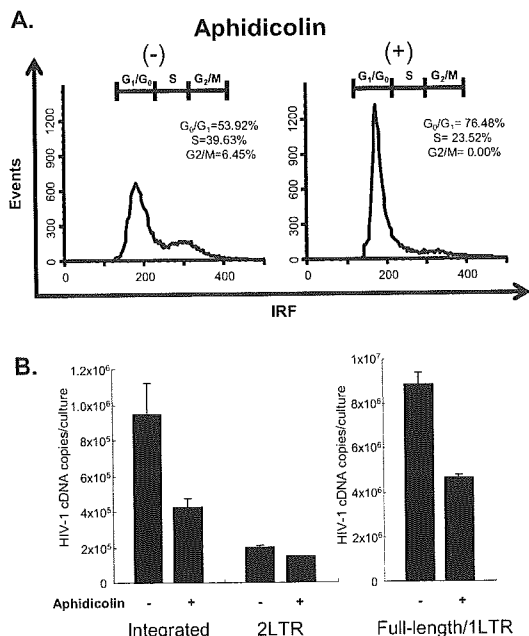


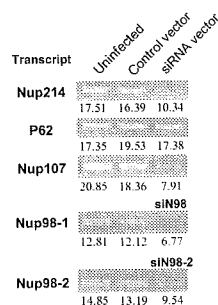
図. 2.

siRNA法によるnucleoporin発現抑制とHIV感染に与える影響。

(A) siRNA発現ウイルスベクターを導入したT細胞におけるnucleoporin mRNA発現量。Nup214 (3694-3714)、p62 (660-680)、Nup107 (470-490)、Nup98 (579-589、2344-2364)に対するsiRNA発現レンチウイルスベクターをMOI 5にて感染させたMT-2細胞における、mRNA発現量を示す。陰性コントロールとしてH2K^bのみ発現するウイルスベクターを用いた。ウイルスベクター感染4日目の細胞からmRNAを回収し、RT-PCRにて解析した。下に示す数字はNIH imageにてバンドの濃度を数値化したものである。

(B) siRNA発現ウイルスベクターによりnucleoporinの発現を抑制したT細胞へのHIVベクターの感染性。Nucleoporinに対するsiRNA発現レンチウイルスベクターを感染後4日目のMT-2細胞に、GFP発現HIVベクターを感染させ、さらに3日後の細胞をFACSで解析した。H-2K^b細胞(siRNA導入細胞)のうち、GFP⁺細胞(HIVベクター感染細胞)の割合を示している。

A.



B.

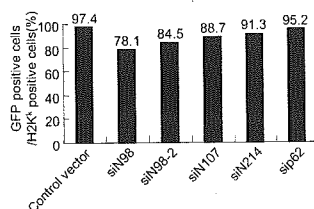


図. 3.

Nup98発現抑制細胞における核膜孔複合体の機能欠損の解析。

(A) Nup98及びルシフェラーゼに対するsiRNA(それぞれsiN98, siLuc)発現プラスミドDNAを導入した293T細胞における、Nup98、Nup96、Nup107、Nup153、Nup214、GAPDHのmRNA発現量をRT-PCRで確認した。下に示す数字はNIH imageにてバンドの濃度を数値化したものである。

(B) Western blotによるNup98蛋白質発現抑制の確認。siLuc及びsiN98をトランスフェクトした293T細胞のNup98蛋白質発現量を抗Nup98抗体で解析した。

(C) siRNAを導入した細胞における他のFG repeat配列をもつnucleoporinの発現 a)と局在 (b)。siRNA発現ウイルスベクターを導入したT細胞をmAb414抗体にてWestern blot a)、ならびに、siLuc及びsiNup98発現プラスミドDNAをトランスフェクトしたHeLa細胞をmAb414抗体にて免疫蛍光染色した(b)。青矢印は核膜洞のシグナルが弱いもの、白矢印は核膜洞ではなく細胞質で凝集したものを示す。スケールバーは30 μ m。

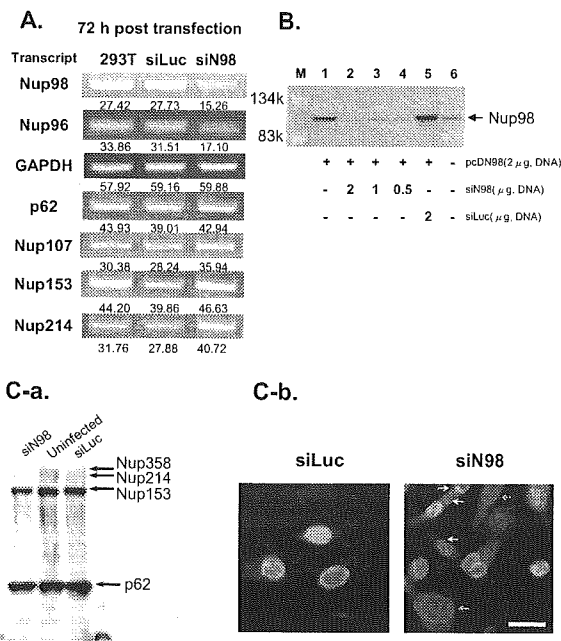


図. 3.

Nup98発現抑制細胞における核膜孔複合体の部分的機能欠損。

(D) Nup98を発現抑制させたHeLa細胞を用いた*in vitro* Nuclear import assay。siLuc及びsiN98発現レンチウイルスベクター感染後3日目のHeLa細胞をdigitonin処理し、DsRedと融合蛋白質として作製したNLS、U1A、rpL23aの*in vitro* Nuclear import assayを行った。NLS-DsRedはimportin- α / β 、rpL23a-DsRedはimportin- β 3、U1A-DsRedは濃度拡散による核内輸送経路のモデルとして用いた。スケールバーは30 μ m。

(E) *in vitro* Nuclear import assayの定量解析。ランダムに選択した5視野の細胞を数え、核内にDsRedが輸送された細胞の割合を示した。*はウェルチのtテストで $p < 0.05$ を示す。

