

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

Mutations of conserved glycine residues within the membrane-spanning domain of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp41 can inhibit membrane fusion and incorporation of Env onto virions.

(in press)

(和文発表)

1) 山本直樹、松田善衛、村上努、駒野 淳

AIDS の新たな治療標的を求めて：HIV-1 の宿主因子 実験医学 Vol.23 No.13 2068-2073 2005

2. 学会発表

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10) Dec 1-3 村上努、篠田知宏、内藤幸美、宮内浩典、磯貝まや、駒野淳、松田善衛、山本直樹. HIV-1 マトリックス蛋白質のウイルス感染前期過程における役割、第19回日本エイズ学会学術集会、熊本

11) Dec 1-3 駒野淳、宮内浩典、Lay Myint、二橋悠子、浦野恵美子、松田善衛、千葉智子、三浦秀佳、杉浦互、山本直樹. Rapid propagation of low-fitness drug resistant mutants of HIV-1 by a -1 frameshift enhancer sparsomycin. 第19回日本エイズ学会学術集会、熊本

12) Dec 1-3 清水佐紀、駒野淳、浦野恵美子、二橋悠子、宮内浩典、磯貝まや、松田善衛、納富香子、小野木利成、武部豊、山本直樹. T-type cyclin/CDK9 複合体の活性化を抑制する細胞内因子による HIV-1 複製制御. 第19回日本エイズ学会学術集会、熊本

13) Dec 7-10 村上努、篠田知宏、内藤幸美、宮内浩典、磯貝まや、駒野淳、松田善衛、Eric Freed、山本直樹. マトリックス蛋白質変異が HIV-1 感染前期

課程や結合宿主因子に与える影響. 第28回日本分子生物学会年会、福岡

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

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

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

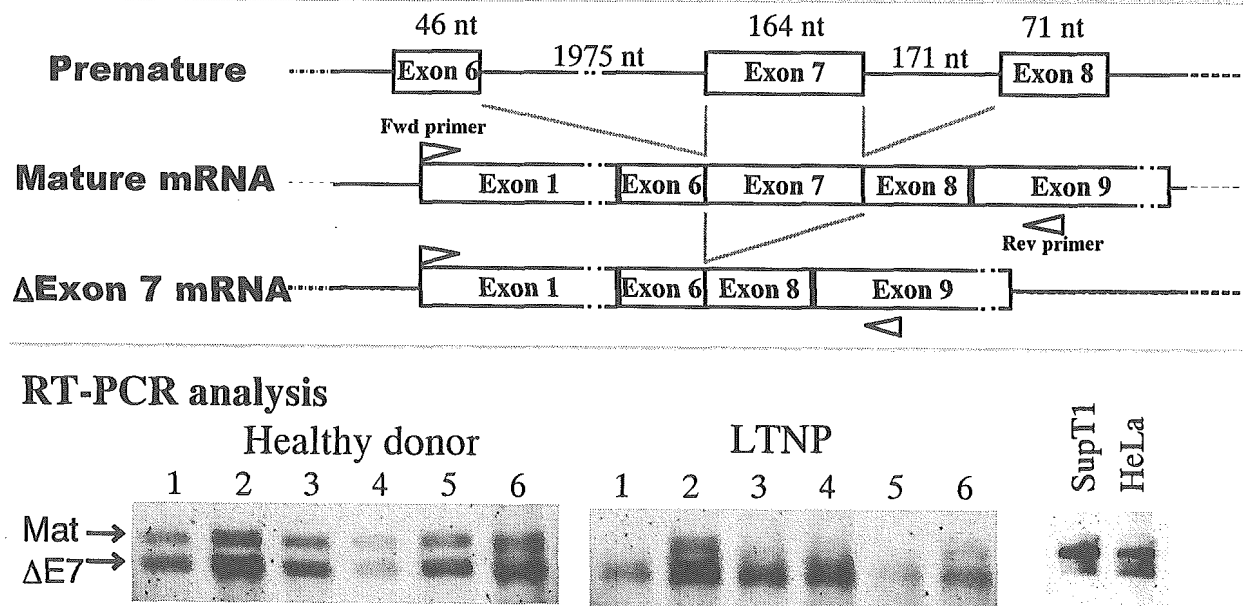
なし

3. その他

CCR5 delta32	CCR2 V64I	IL10 5'A
CCR5 P1	CCL5 Ini-1.1c	CXCR6 E3K
IL4 promoter	HLA A1	HLA B8
HLA B*57	HLA B*27	
IFNG-179T	HLA A2/A28	
L11 H7	CXCL12/SDF1a 3'A	
CCL2-CCL7-CC	CX3CR1 I249M280	
HLA B22	HLA B*35-Px(3501, Cw4)	
HLA B18	KIR 3DS1 w/HLA-Bw4	

表 1. エイズ病体進行に関連する既知のヒトゲノム遺伝子

More Δ Exon 7 splice variant of gene A mRNA expressed in long term non-/slow-progressors



Ratio of high Δ E7/Mat transcript:

Chi square test: $P=0.040$ ($N=18$: 1/7 v.s. 7/11)

***Haemophilia on HAART: 5/7**

図 1. エイズ病体進行に関連する候補遺伝子 A の転写産物の検出

```

1 atggaggagagaggaagaacaacaacacggtggtatttcactcgagaacagctggaaaatagccc--atcccgctg--tlttggcgtgg-accagat-aaagaa-ctttctt-atcgccag 117
      20          40          60          80          100
      * * * * *
843 =====TC*CTTTGTCGACCTTTTATCGGGTAAGGGCAACCAAAAACCGCAC*GGGTC*TAATTTCTT*GAAAGAAATA*CGGTC 762
      840          880          920          960          1000
118 caggcgcc-aatc-tgcttca-ggacat-ggggcagcgtcttaacgtctcacaatt-ga-ctatcaacactgctatagatatacagctgctctacatgattcagctcctcacacagttocc 236
      120          140          160          180          200          220
      * * * * *
761 GTCCGCCG*TTAG*ACGAAGTCCCTGTACCCCGTCGCAGAATTGCAGAGTGTAAACTAGTAGTGTGACGATATCATATGTACGTACCTAAATGTACTAAGTCAGGAGTGTCTCAGG 637
      760          780          800          820          840          860          880          900
237 tggaaa-ttctgtgctccagcagccttgtttctagcagctaaagtggaggagcagcccaaaaaattggaacatgcatcaaggtagcacatacttgtctccatcctcaggaatccctctctgat 360
      240          260          280          300          320          340          360
      * * * * *
636 ACCTTAAAGACACCGAGSTCGTCGGAACAAGATCGTCGATTCACCTCCCGTCGGG*TTTTAACCTTGTACAGTAGT*CCATCGTGTATGAACAGAGGTAGGAGTCCTTAGGGAAGGACTA 512
      620          640          660          680          700          720          740          760
361 actagaagtgaggcttattgcaacaagttcaagatctggtcattttagaagcataatttgcagactttaggcttgaactaacaattgatcacccacatactctgtagtaagtgcactca 485
      380          400          420          440          460          480
      * * * * *
511 TGATCTTCACTCCGAATAAACGTTGTCAAGTTCAGACCAATTAATCTTTTCGTATTAAGCGTCTGAAA*CCGAACTTGATTGTAACTAGTGGGTGTATGAGTACATCATTTACGTCAGT 387
      500          520          540          560          580          600
      * * * * *
486 acttgttcgagcaagcaaggacttagcacagacttcttacttcatggcaacacagcctgctgattgaccacatttagcctgcagtacacacctcctggtggtctgtgtgcattcacctgg 610
      480          500          520          540          560          580          600
386 TGAACAAGCTCGTTCCTGAATCGTGTCTGAAGAATGAAGTACCGTTGCTG-----Exon 7----- 331
      380          400          420          440          460          480          500
611 cttgcaagtggccaattgggagatcccagcttccaactgacgggaagcactggtgggagtatggtgacgccactgtgacctggaacttttagatgaactgacacatgagtttctacagatttg 735
      620          640          660          680          700          720
      * * * * *
330 -----Exon 7-----CTTGACTGTACTCAAGATGCTTAAAC 301
      320
736 gagaaaaactcccaacaggctcaaacgcatttggaaattggaggcatgagaggctgccaagaaaaaaaagcagatgaccgaggaacagatgaaaagacttcagagcagacaatcctcaatgat 860
      740          760          780          800          820          840          860
      * * * * *
300 CTCTTTTGAGGTTGTCGAGTTTTCGTAACCTTAACCTCCCGTACGCTCCGACGTTCTTTTGTTCGTCTACTGGCTCCTGTCTACTTTCTGAAAGTCTCGTCTGTTAGGAGTTATACTA 176
      300          320          340          360          380          400          420          440          460          480
861 tcccagagctcttcagacacaaccattgcaggtttaatgagcatgcaacttctaccacaagtgcagtgcttccctgcccagctcccgagagtcactccagcaacttaaccagtgaggagtg 985
      880          900          920          940          960          980
      * * * * *
175 AAGGGTCTCGAGAAGTCTGTGTTGTTACGTCCTCAAAATTACTCGTACAGTTGAAGATGTTGTTACGTCACGGAAGGACGCTCAGAGGCTTCTCAGTAGGTCGTTGAATTGGTCAACCTCTACA 51
      160          180          200          220          240          260          280          300
986 tgcgggcaagcgttggctgtcctcccaacctcttctcaactagaacctactcagggctcatcggactagtgagaatttagcacttacaggagtgtgatcatccttaccacagatggttcaaat 1110
      1000          1020          1040          1060          1080          1100
      * * * * *
50 ACGGCCGTTTCGCAACCGACAGGAGGTTGGAAGAA=GT*TGA=CT===== 7
      40          20

```

図 2. エイズ病体進行に関連する候補遺伝子 A の短いプライスバリアントの塩基配列

CD8 antigen, beta polypeptide 1 (p37)
 absent in melanoma 2
 signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
 tripartite motif-containing 4
 SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2
 guanylate binding protein 5
 leucine aminopeptidase 3
 pre-B-cell colony enhancing factor 1
 proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9 (large multifunctional protease 2)
 non-kinase Cdc42 effector protein SPEC2
 interferon regulatory factor 7
 B aggressive lymphoma gene
 Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)
 CD8 antigen, alpha polypeptide (p32)
 metallothionein 1H-like protein, 1X, 2A
 transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
 endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
 major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1
 guanylate binding protein 5
 interferon-induced protein 44
 Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)
 guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa
 signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
 2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa
 lymphocyte antigen 6 complex, locus E
 epithelial stromal interaction 1 (breast)
 guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa
 cyclin-E binding protein 1
 myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4
 pre-B-cell colony enhancing factor 1
 interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
 interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)
 Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor for (CD16)
 表 2. エイズ病体進行に関連するヒトゲノム遺伝子 (抜粋)

研究課題： HIV-1 サブタイプ B' 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析

分担研究者： 草川 茂（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

東南アジアおよび中国における代表的な流行株のひとつであるサブタイプ B' 分離株 B106 から、新たに 4 クローンの感染性分子クローンを樹立した。PHA 刺激 PBMC では、DB4 が早い kinetics でよく増殖するのに対し、他の 3 クローンはゆっくりと増殖した。DB4 は CXCR4 と CCR5 の両方をコレセプターとして使用するのに対し、他の 3 クローンは CCR5 のみを使用した。M8166 では DB4 のみが細胞変性を伴いながら増殖した。マクロファージでは、3 クローンの R5 ウイルスが増殖したものの、dual tropic ウイルスである DB4 は増殖を認めなかった。T cell line やマクロファージでよく増殖する感染性分子クローンが得られたことで、より幅広いウイルス学的研究への応用が期待できると考えられた。

A. 研究目的

これまでウイルス学研究に用いられてきた HIV-1 感染性分子クローンのほとんどがサブタイプ B（欧米型サブタイプ B）であった。我々は、東南アジア諸国における HIV-1 流行株がサブタイプは B'（アジア型サブタイプ B）、C、CRF01_AE とその組換体であることを報告してきた。当地域における HIV-1 流行株の感染性分子クローンを樹立することは、サブタイプ間組換体の出現機構等、東南アジアにおいて流行している HIV-1 のウイルス学的研究や、この地域における予防・治療法の開発にとって有用である。昨年度、サブタイプ B' 分離株 B106 から PBMC で増殖できる感染性分子クローン B106_22 を樹立したことを報告したが、このクローンは分離ウイルスが増殖できる T cell line やマクロファージでは増殖しなかったため、今年度、これらの細胞で増殖するクローンの樹立を試みた。

B. 研究方法

分離株 B106 は、ミャンマーの首都マンダレーにおいて 1995 年に IDU による感染者から収集した全血から PBMC 共培養法により分離した。B106_22 が T cell line やマクロファージで増殖できない責任領域は、B106_22 と T cell tropic の NL432、マクロファージ tropic の AD8 との間

換えウイルスを作製し検討した。新しい感染性分子クローンを得るために、その領域を Pfu ポリメラーゼを用いて増幅し、B106_22 の該当する部位に挿入したクローンを作製した。

感染性のスクリーニングは、得られたプラスミドをそれぞれ 293T 細胞に transfect し、ウイルスの産生を確認した後、あらかじめ PHA で刺激した PBMC に感染させ、感染性を検討する方法で行った。coreceptor usage は、CD4 と CXCR4 または CCR5 を発現させた NP2 細胞におけるシンシチウム形成とウイルス産生を指標として決定した。T 細胞株への感染性は、M8166、MT2、CEMx174 細胞で検討した。マクロファージへの感染性の検討は、末梢血由来単球を M-CSF で 1 週間誘導したもので行った。

C. 研究結果

B106_22 と T cell tropic の NL432 の間で tat ~ env 遺伝子を含む領域を組換えた組換えウイルス B106/NLenv_1 を作製し、M8166 細胞への感染性を検討したところ、NL432 同様に良く増殖した（図 1）。MT2、CEMx174 細胞でも同様な結果が得られた（data not shown）。しかしながら、env V1 ~ V3 を組換えたウイルス B106/NLenv_2 は、M8166 のみならず他の T cell line や PBMC、NP2 でも感染性を認めなかった。マクロファージ tropic の AD8 との間

で同様な組換えウイルスを作製し、マクロファージへの感染性を検討したところ、tat ~ env 遺伝子を含む領域を組換えた B106/AD8env_1、env V1 ~ V3 を組換えた B106/AD8env_2 とともに AD8 よりやや遅い kinetics ではあるが、シンシチウムを形成しながら増殖した (図 2)。以上の結果から、B106_22 が T cell line やマクロファージで増殖できない責任領域がこの領域内にあり、B106_22 のこの領域を組換えることによって、分離ウイルス同様 T cell line やマクロファージで増殖する感染性分子クローンが得られることが推測された。

そこで図 3 に示したように、V1 から V3 を含む領域を PCR 法で増幅し、B106_22 の該当する部位に挿入したクローンを作製し、スクリーニングを行った。12 のうち 9 クローンで PBMC に対する感染性を認めた。そのうち 4 クローンについて、その性質を検討した。

PBMC では、4 クローンのうち、DB4 がやや早い kinetics でよく増殖し、残り 3 クローンはややゆっくりとした kinetics で増殖した (図 4)。coreceptor usage を検討したところ、PBMC で早い kinetics で増殖した DB4 は、B106_22 と同様 CXCR4 と CCR5 の両方を coreceptor として使用する dual tropic ウイルスであった。残りの 3 クローンは、CCR5 のみを coreceptor として使用する R5 ウイルスであった (図 5)。M8166 に対しては、dual tropic ウイルスである DB4 のみが細胞変性を伴いながら増殖した (図 6)。MT2、CEMx174 細胞でも同様な結果であった (data not shown)。マクロファージでは、DB3 が最も早く、次いで DB2 が早い kinetics で増殖した (図 7)。DB1 もわずかながら増殖を認めたが、DB4 は 19 日目まで培養を続けても全く増殖を認めなかった (図 7)。図 8 に、各クローンの性質をまとめたものを示した。

D. 考察

昨年報告したサブタイプは B' の感染性分子クロー

ン B106_22 は、PBMC でよく増殖し、NP2 や MAGIC5 等の coreceptor を発現する接着性の細胞ではよく増殖するものの、分離ウイルスが増殖できる T cell line やマクロファージでは増殖しなかった。MAGIC5 を用いた中和試験や薬剤耐性試験のための道具としては有用であるが、本年度は、T cell line のような浮遊細胞を用いた研究の道具として用いることができるクローン、分離ウイルスと同様、広い宿主細胞で増殖する感染性分子クローンの樹立を目指し、新たなクローンの作製を行った。

NL432 や AD8 との組換え体を用いた感染実験の結果から T cell line やマクロファージで増殖能を欠く責任領域を特定し、その領域を新たに PCR で増幅したフラグメントと置換することで、新たな感染性分子クローンを得た。昨年度、gag ~ nef を組換えたクローンを作製してスクリーニングした時には、PBMC で増殖するクローンは 24 のうち 1 つだけであったのに対し、今回の方法では、増幅する領域を短い領域に絞り込んだこと、増幅する領域を短くしたために、より fidelity の高い耐熱性酵素を用いることができたことで、12 のうち 9 の PBMC に感染性を持つクローンを得ることができた。

今回得られたクローンは、図 8 に示したようにそれぞれ異なるウイルス学的性質を有していた。分離ウイルス B106 は、CXCR4 と CCR5 の両方を coreceptor として使用し、T cell line、マクロファージで増殖するウイルスであったが、今回の結果は、その中に CXCR4 を coreceptor として使用する T cell line でよく増殖する quasispecies と、CCR5 のみを使用しマクロファージで増殖する quasispecies が含まれていることを示している。T cell line でよく増殖するクローンと、マクロファージでよく増殖するクローンが得られたことで、より広いウイルス学的研究への応用が期待できる。

E. 結論

これまで、アジア地域の HIV-1 流行株のウイル

ス学的研究や、予防・治療法開発の基盤構築の一つとして、この地域の流行株の感染性分子クローンの構築を行ってきた。サブタイプB' は、この地域の代表的な流行株の一つである。昨年度報告したサブタイプB' の感染性分子クローン B106_22 は、PBMC や MAGIC5 を用いた中和試験や薬剤耐性試験の道具としては有用であるが、今年度の研究の結果、T cell line やマクロファージでよく増殖する感染性分子クローンが得られたことで、より幅広いウイルス学的研究への応用が期待できる。このことは、将来の予防・治療法の開発にとって重要な知見であった。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Molecular epidemiology of the heterosexual HIV-1 transmission in Kunming, Yunnan Province of China suggests origin from the local IDU epidemic.

Li XJ, Kusagawa S, Xia X, Yang C, Wang Q, Yokota Y, Hoshina Y, Onogi T, Nohtomi K, Imamura Y, Shiino T, Yang R, Yamamoto N, Ben K, Takebe Y. AIDS Res Hum Retroviruses. 2005

Nov;21(11):977-80.

Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against simian immunodeficiency virus SIVmac239 in a macaque AIDS model.

Mori K, Sugimoto C, Ohgimoto S, Nakayama EE, Shioda T, Kusagawa S, Takebe Y, Kano M, Matano T, Yuasa T, Kitaguchi D, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y.

J Virol. 2005 Aug;79(16):10386-96.

2. 学会発表

草川茂、武部豊：広い宿主域と高い贈職能を持つ HIV-1 CRF08_BC 感染性分子クローンの樹立。第 5

3 回日本ウイルス学会学術集会総会、2005 年 1 月

草川茂、武部豊：HIV-1 サブタイプ B' 感染性分子クローンの樹立とその性状の解析。第 19 回日本エイズ学会学術集会総会、2005 年 12 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

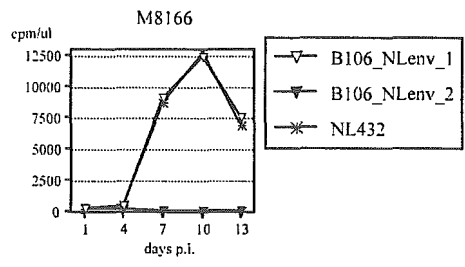
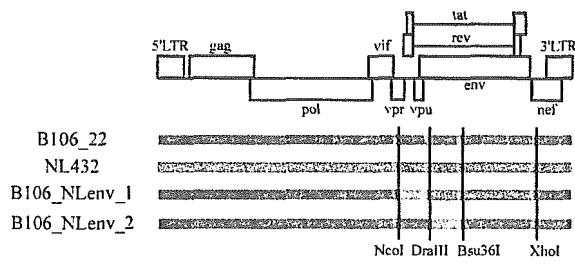


図 1 : B106_22 が T cell line で増殖できない責任領域の同定

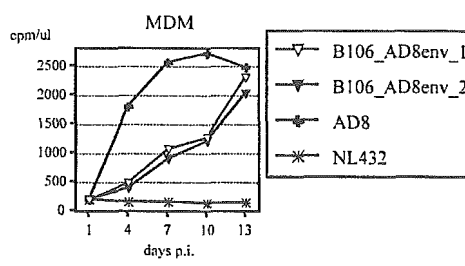
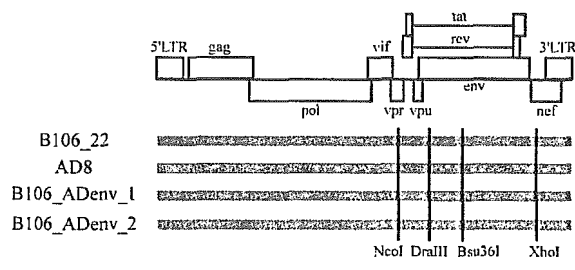


図 2 : B106_22 がマクロファージで増殖できない責任領域の同定

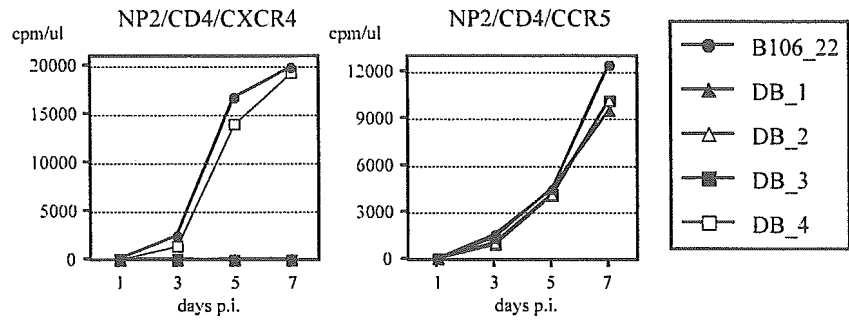


図5：新しい感染性分子クローンの coreceptor usage

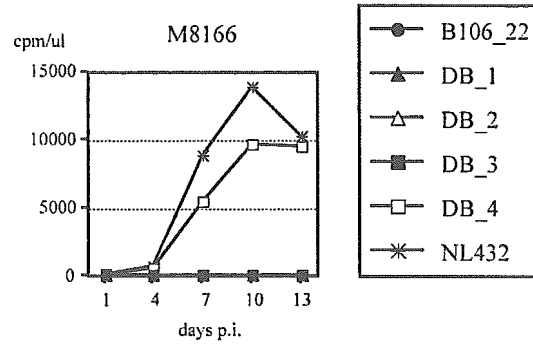


図6：新しい感染性分子クローンの M8166 における増殖能

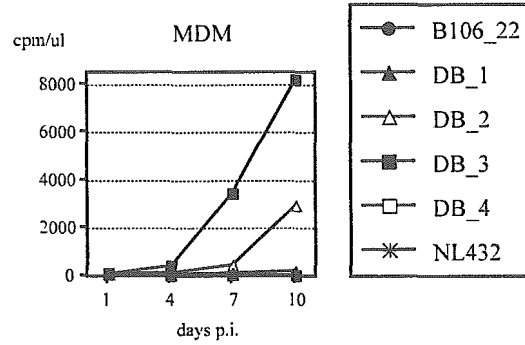


図 7 : 新しい感染性分子クローンのマクロファージにおける増殖能

表 1 : 本研究で得られた感染性分子クローンのウイルス学的性質

	PBMC	Coreceptor usage	M8166	MDM
B106_22	rapid/high	X4/R5	--	--
DB_1	slow/low	R5	--	+
DB_2	slow/low	R5	--	++
DB_3	slow/low	R5	--	+++
DB_4	rapid/high	X4/R5	+++	--

研究課題：タイ型 HIV-1 ヴァリアント CRF01_AE の高度薬剤耐性変異に関する分子進化学的解析
とそれをを用いたレトロウイルス組換え解析系の開発の試み

分担研究者：椎野 禎一郎（国立感染症研究所エイズ研究センター・主任研究官）

研究要旨

CRF01_AE の国内の家族内感染例 [NH1（父親）→NH2（母親）→NH3（子供）] のうち HAART 中に薬剤耐性の兆候を現した NH3 には、逆転写酵素のフィンガー領域の 11 アミノ酸挿入変異（69Ins）による高度・多剤耐性変異ウイルスが発生していた。NH3 より経時的に採取した検体を用いた逆転写酵素領域の分子進化学的解析から、この高度多剤耐性形質は 69Ins を含むフィンガー領域の変異群（M41L, 69Ins, T69I）とパーム領域の変異群（L210W, T215Y）間の遺伝子組換えによって生まれた可能性がある。我々は、高度多剤耐性の表現型を利用してフィンガー領域とパーム領域の間で組換えが生じたウイルスを選択できることに注目し、この領域に生じる交叉と組換えの詳細な解析を試みている。この解析のために、L210W, T215Y を持った CRF01_AE 感染性クローンのフィンガーとパーム領域間の約 400 ヌクレオチドの領域に存在する 20 個の制限酵素サイトに、それぞれアミノ酸配列を変えないように変異を導入した変異ウイルスクローン（NH1-RT Δ RS_WY）を作成した。NH1-RT Δ RS_WY と M41L, 69Ins, T69I を持った CRF01_AE 感染性クローンを共感染させることで、培養細胞において交叉点が明確な組換えウイルスを大量に発生させることが可能となった。

A. 研究目的

HIV-1 には、塩基配列によって系統的に分類可能なサブタイプのほかにサブタイプ間の組換えで生じたと思われるウイルスが存在する。こうした組換えウイルスの中には、従来のサブタイプと同様に感染を広げている型（circulating recombinant form: CRF）も見つかっている。特に東南アジアから東アジア地域ではこうした CRF が疫学的に重要な型となっている。また、これらの地域のいくつかでは、dominant な CRF

や純粋な subtype が、個々の感染者において複雑な再組換えを起こした unique recombinant form (URF) が集団の重要な要素を占めており、HIV ゲノムが感染過程で組換えを起こす機構に注目が集まっている。アジア地域で現在起こりつつある現象は、HIV-1 の組換えがある条件下ではかなりの頻度で生じることを示している。これらのウイルスのゲノム構造には、組換えの際に交叉が生じるサイトに共通点があるように見える。本研究は、HIV-1 の組換えの起きるゲノム

上の位置を遺伝学的に解析し、ウイルスゲノムの組換えの機構を知ることが目的とする。

B. 研究方法

組換えの位置と頻度を遺伝学的に知るためには、ゲノム上に組換えが起こったことを示すマーカー遺伝子を置く必要があるとともに、組換えを起こしたウイルスのみを選択する系があることが望ましい。本研究では、疫学的調査で明確な組換えが観察されている逆転写酵素領域(RT領域)の薬剤耐性変異を選択に用い、組換えを観察する400bp弱の領域に制限酵素切断サイトの同義置換変異をマーカー遺伝子として導入した。この組換え HIV-1 を用いて、さまざまな条件下での組換えのパターンを観察する。

実験に利用するウイルス株は、佐藤らによって作成された CRF01_AE の感染性クローン(93JP-NH1)を改変したものを用いた。我々は、このクローンと同系統のウイルス株に感染し抗ウイルス剤療法を受けた感染者(NH3)の血液検体の提供を受け、その RT 領域の変異を塩基配列と薬剤耐性の両面から観察した。薬剤治療後の検体にある耐性ウイルス株は、佐藤らによって報告された活性部位の大きな挿入配列と点突然変異(M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y)によって、複数の NRTI に対して高い耐性を獲得している。多重薬剤に対する高耐性を発現するためには、これらの変異のすべてがそろふ必要がある。挿入配列は、K70R の近傍に位置するため、M41L, K70R と挿入配列のみを持つウイルス株と、L210W, T215Y のみを持つウイルス株を作成し、両者を複数の NRTI 存在下で共感染させれば、これらの突然変異のおよそ 400bp の間に組換えが生じるか、または複数の点突然変異が生じた場合のみ、感染が成立する。組換えと新たな点突然変異を区別するために、これらのウイルス株

では、K70R の 30bp 下流と L210W の 7bp 上流に存在する ScaI の切断部位を同義置換で切断不能に改変した。さらに、L210W, T215Y を持つクローンを元に、400bp の中間部に存在し同義置換での改変が可能な 17 箇所の制限酵素切断部位をすべて改変したウイルス(NH1-RT Δ RS_WY : 図 1)を作成した。NH1-RT Δ RS_WY と M41L, 69Ins, T69I を持った CRF01_AE 感染性プラスミドを 1:1 の割合で HeLa 細胞に co-transfection し、共感染実験用のウイルス上清を作成した。このウイルス上清を、1000TCID のウイルス濃度で NP2-CD4-CCR5 細胞および NP2-CD4-CXCR4 細胞に感染させ、上清を経時的に全量採取した。上清中の遊離ウイルス中の RT 遺伝子領域を高精度・低組換え率の RT-PCR で増幅したのち、DNA クローニングを行い 1 実験区あたり 32 本以上の塩基配列を決定した。塩基配列データは、アライメントを行ったあと、MEGA 3 を用いて組換え点の解析を行った。遺伝子セグメントにおける交叉率は、Kosambi の公式 ($y=1/2 \tanh 2x$) を用いて多重組換えの補正を行った後、1 日あたり 100bp あたりの割合に換算した。培養液にさまざまな濃度の NRTI を加えることで、組換えウイルスの遺伝子型とその発生頻度を解析した。すべての実験区の交叉率を用いて、平均値の t 検定を行った。

C. 研究結果

感染者 NH3 の血清中および PBMC より見出された RT 領域の塩基配列を元に、NH3 に存在した耐性変異の組み合わせを持つ 9 種類の 93JP-NH1 変異株を作成し、これらのウイルスの NRTI に対する耐性を MAGIC5 への感染性を用いて調べた。その結果、突然変異は単独で AZT と 3TC への耐性獲得に効果があること、挿入変異は点突然変異の存在するウイルスにおいて耐性を若

干上昇させることが確かめられた (図 2)。5'側の変異 (M41L, D67N, 挿入配列, T69I) のみを持つウイルスと、3'側の変異 (L210W, T215Y) のみを持つウイルスは、いずれも AZT には野生型の約 6 倍、3TC は 3~4 倍、ddI は約 3 倍の耐性を示した。また、41L・挿入変異・69I・210W・215Y の 5 つのアミノ酸変異を持つウイルスには AZT, 3TC への極めて高い耐性があり、同時に d4T, ddI, ddC への耐性が獲得される。このことから、培養液中に AZT と ddI を 2.5 μ M 以上の濃度で加えることで、5'側・3'側それぞれの変異のみをもつウイルスの間の組換えの結果としての 5 つのアミノ酸変異を持つウイルスを選択できることが期待された。

210W・215Y の 2 つの NRTI 耐性変異を持つクローンを元に、挿入変異部位 (In79) と 210W の間にある 17 箇所の制限酵素切断部位をすべて欠失させた変異クローン (NH1-RT Δ RS_WY) を作成した。変異クローンは、93JPNH1 と同様の感染性と細胞指向性を持っていた (図 3)。さらに、この制限酵素切断部位欠失クローンと、M41L, D67N, 挿入配列, T69I を持つ感染性クローン (NH1-LI) を HeLa 細胞に co-transfection し、NH1-RT Δ RS_WY/NH1-LI 混合株を作成した。RT-PCR と制限酵素解析によって、この株内には NH1-RT Δ RS_WY と NH1-LI のゲノムがおおよそ 4:6 で含まれていることが確認された。

組換えウイルスゲノムを大量に構造解析するため、96well-microtiter plate を用いた細胞・上清からの RT 領域の RT-PCR~クローニング~塩基配列決定の手順を確立した。RT-PCR を用いたクローニング手法は、PCR 反応中に組換えが生じてしまうが、これの大半は部分的に増幅した断片が次の増幅過程に介在して生じる現象であり、伸長反応を十分に長くとることで回避することができた (図 4)。

NH1-RT Δ RS_WY/NH1-LI 混合株を用いて、T-cell line への共感染実験や MAGIC5A を用いた単一細胞に感染した provirus 由来のウイルスの単離実験を行ったが、いずれも AZT+ddI による組換えウイルスの効果的な選択に失敗した。そこで、CD4 および co-receptor が高発現し、多重感染が高率で生じることが期待できる NP2-CD4-CCR5 および NP2-CD4-CXCR4 を宿主細胞として、比較的長期の共感染・培養実験を行ったところ、複製後の子孫ウイルス配列を感染 3 日目より検出することができた。組換えウイルスは 3 日目の検体から低頻度で出現し、10 日目以降は高頻度に観察された。組換え RT の遺伝子型は、培養液中に NRTI が存在しないときには野生型が優勢であり、M41L, D67N, K70R, L210W, T215Y (LIWY 型) の遺伝子型を持つ RT は NRTI の濃度に依存して選択を受けていた (図 5)。得られた組換え体の塩基配列解析から、RT のこの領域 (約 400bp) では組換えの生じにくい領域が 2 箇所検出されたが、乗換え点の分布は塩基長とほぼ比例関係にあり組換えが極端に生じやすい領域は存在しなかった (図 6)。この実験系では、得られたウイルスはすでに何世代かを経過しておりその間の自然選択や機会的浮動の影響を受けているため、サンプル集団の誤差分布を再検討する必要があるものの、組換えは特定のホットスポットで生じているわけではなさそうに見える。

D. 考察

これまでの知見から、検出可能な組換えはヘテロ接合体のウイルス粒子が感染した細胞における逆転写過程で生じると考えられている。この研究では、co-transfection の系を用いてヘテロ接合体のウイルス粒子を人工的に作り出し、薬剤耐性の違いを用いて組み換え体のみを検出す

ることを企図した。NH1-LI, NH1-RT Δ RS_WY および LIWY 型の薬剤耐性は、MAGIC-5 法による phenotyping で観察する限り明確な差異が認められる。2.5 μ M の NRTI 濃度は、LIWY 型のウイルスの fitness が NH1-LI, NH1-RT Δ RS_WY のそれをはるかに上回る。にもかかわらず、MAGIC-5A を用いた短期間の培養では、RT-PCR で採取されたウイルス配列はほとんどが元株のもので組換え体はまれであった。このことは、co-transfection で作られたサンプル上清中において、ウイルスゲノムがヘテロ接合体になっているウイルス粒子が推測値よりかなり少ないことを示す。

ヘテロ接合体のウイルス粒子は、同一細胞に 2 種類の異なる遺伝子型を持つウイルスが感染した場合 (co-infection) にのみ発生する。したがって通常の in vitro 感染実験では、たとえ co-transfection による人工ヘテロウイルスが少なくても、反復感染で生じたウイルス粒子に一定の割合でヘテロ接合体が存在するはずである。このヘテロ接合体の割合は、co-infection を起こした細胞の頻度によって決まるため、組換えを効率的に起こすには MOI を上げて重複感染が頻繁に生じる培養条件を作り出す必要がある。事実、このウイルスは MT-2 での kinetics が NP2-CD4 に比べて悪く、共感染実験でも MT-2 では効率的に組換えを生成できなかったが NP2-CD4 では組換えの観察に成功している。NP2-CD4 においても、組換え体が選択されるには 10 日以上培養時間を要する。培養液中にウイルスが相当の濃度で増えてこないかぎり、co-infection から組換えの過程はまれだと思われる。まして、生体内ではやはり組換えは単一現象としては稀であり、感染者体内の膨大なウイルスコピー数とその複製頻度によって達成されていると考えられる。検出された組換えウイルスは、複製を何世代も

繰り返したものと推測される。祖先ウイルスでの選択や機会的浮動の効果が推定できないかぎり、こうしたウイルスの頻度をもって、配列部位による乗換えの起こりやすさを検討することは危険である。ただし、これまでの研究でも、この領域の乗換えがある特定の部位でのみ生じているのではという当初の疑問は否定できそうである。CRF や URF に見られる組換えのホットスポットは、上述の系統関係上の関連性によるか、乗換え後のサブタイプ間組換え変異が fitness を落とすことによる負の選択によるものではないだろうか。

E. 結論

RT 領域の異なる遺伝子型間の組換えを詳細に観察できるモデルを構築した。組換えウイルスの生成には、高い MOI でのウイルス培養が必要であり、通常の in vitro 培養条件では複数回の複製が生じる必要がある。検出された組換え体は複数回の複製による効果を考慮する必要があり、詳細な頻度には言及できないが、明確な組換えホットスポットは観察されなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 : Construction of the cleavage-siteless RT virus, NH1RT-WYΔRS

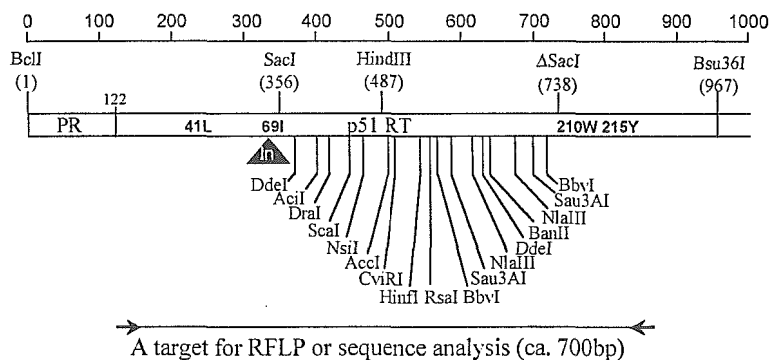
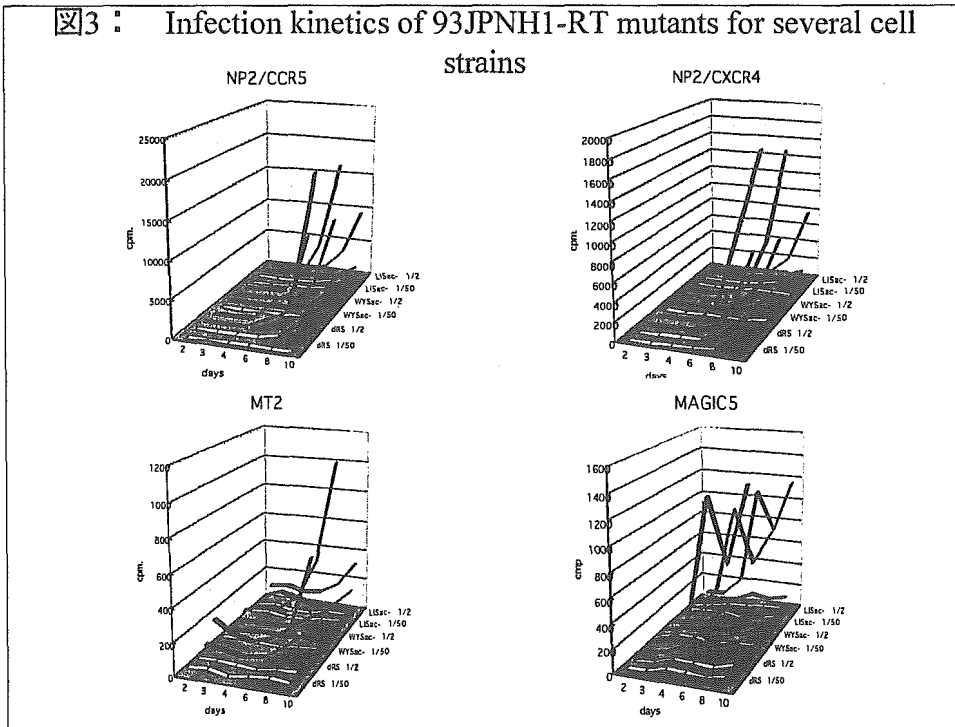


図2 :

Table Phenotypic assay for drug susceptibility of some variants existing in NH3.

variants	41		67		69		70		210		215		ZidV	ddC	NVP
	M	D	In	T	K	L	T	ZidV	ddC	NVP					
NL432	+	+	-	+	+	+	+	+	0.026 ² M	0.66 ² M	0.76 ² M	1.90 ² M	???? ² M	0.042 ² M	
NH-RTvar1	+	+	-	+	R	W	+	+	0.064 ² M x 2.46	0.50 ² M x 0.75	0.40 ² M x 0.52	2.90 ² M x 1.52	0.26 ² M x 0.52	0.028 ² M x 0.66	
NH-RTvar2	+	+	-	+	R	W	Y	+	0.210 ² M x 8.07	2.20 ² M x 3.33	1.20 ² M x 1.57	???? ² M x 1.57	0.26 ² M x 0.50	0.017 ² M x 0.40	
NH-RTvar3	+	+	-	+	+	W	Y	+	0.160 ² M x 6.15	1.90 ² M x 2.87	1.00 ² M x 1.31	5.40 ² M x 2.84	0.46 ² M x 0.92	0.015 ² M x 0.35	
NH-RTvar4	L	+	-	I	+	+	+	+	0.042 ² M x 1.61	2.10 ² M x 3.18	0.44 ² M x 0.57	???? ² M x 1.47	0.15 ² M x 0.30	0.074 ² M x 1.76	
NH-RTvar5	L	+	In	I	+	+	+	+	0.150 ² M x 5.76	3.00 ² M x 4.54	0.40 ² M x 0.52	4.40 ² M x 2.31	0.38 ² M x 0.76	0.040 ² M x 0.95	
NH-RTvar6	L	N	In	I	+	+	+	+	0.150 ² M x 5.76	1.00 ² M x 1.51	0.68 ² M x 0.89	???? ² M x 1.47	0.38 ² M x 0.82	0.044 ² M x 0.52	
NH-RTvar7	L	N	In	I	+	W	+	+	0.340 ² M x 13.07	3.00 ² M x 4.54	0.68 ² M x 0.89	2.80 ² M x 1.47	0.41 ² M x 0.82	0.022 ² M x 0.52	
NH-RTvar8	L	N	In	I	+	W	Y	+	>10 ² M x 384	>100 ² M x 152	8.80 ² M x 11.57	22.0 ² M x 11.6	2.70 ² M x 5.40	0.019 ² M x 0.45	
NH-RTmt3	L	+	In	I	+	W	Y	+	>10 ² M x 384	100 ² M x 152	15.0 ² M x 19.9	27.0 ² M x 14.2	2.70 ² M x 5.40	0.023 ² M x 0.54	

☒3 : Infection kinetics of 93JPNH1-RT mutants for several cell strains



☒4 : Detection of the viral progenies in the culture

