

表1B.  
SCIDマウスへCD34陽性細胞の移植実験  
マウス末梢血におけるヒトCD19陽性、CD3陽性細胞率

Strain	cell numbers (Gy)	dose (Gy)	pup sex	6 W			10-12 W			15-16 W			45W			survival weeks
				CD45	CD19	CD3	CD45	CD19	CD3	CD45	CD19	CD3	CD45	CD19	CD3	
Rag2KO	40,000	2.4	♀	7.4	7.4	<0.01	12	9.0	1.0	24	13	10	0.2	<0.1	0.2	>45
Rag2KO	40,000	2.4	♀	3.2	3.2	<0.01	4	3.46	0.57	3	1.6	1.4				>44
Rag2KO	37,500	2.4	♀	4.4	4.11	<0.01	14	14.1	0.3	15.5	13.5	2.0				36
Rag2KO	20,000	2.4	♀	1	0.88	<0.01	6.1	4.6	1.34	5.6	0.8	5.0				33
Rag2KO	75,000	2.4	♂	2.4	2.13	<0.01	4	4	0.22	1.1	0.64	0.42				>36
Rag2KO	82,500	3.5	♂	7.5	7.5	<0.01	13.4	11.8	2.2	0.9	0.3	0.6	0.8	<0.01	0.2	>28
Rag2KO	82,500	3.5	♂	1.1	1.1	<0.01	3.6	1.7	2.2	6.3	0.2	6.2	0.61	0.2	0.6	>28
Rag2KO	82,500	3.5	♂	2	2	<0.01	1.3	1.0	0.8	3.0	0.2	2.4	0.72	0.2	0.5	>28
Rag2KO	82,500	3.5	♂	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.16	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	>28
Rag2KO	82,500	3.5	♂	11.3	11.3	<0.01	10.9	10.5	0.5	19.4	13.4	1.7	4.85	0.65	4.25	>28
Rag2KO	82,500	3.5	♀	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01				26
Rag2KO	82,500	3.5	♀	17.1	17.1	<0.01	19	17.6	0.4	8.8	7.6	0.6				26

28W

表2. NOGマウスにおけるヒト細胞の構築

Strain	cell numbers	dose (Gy)	pup sex	6 W			10-12 W			15-16 W			survival weeks
				CD45	CD19	CD3	CD45	CD19	CD3	CD45	CD19	CD3	
NOG	38,000	1.2	♂	1.2	1.2	<0.01	0.5	0.5	<0.01	ND	ND	ND	15
NOG	38,000	1.2	♂	6.2	6.2	<0.01	8.2	4.7	3.2	11.3	3.4	6.6	21
NOG	38,000	1.2	♂	7.9	7.9	<0.01	9.3	8.6	0.3	NT	NT	NT	17
NOG	38,000	1.2	♂	9.3	9.3	<0.01	9.8	7.8	1.8	11.8	3.3	6.6	18
NOG	38,000	1.2	♀	NT	NT	<0.01	0.5	0.5	<0.01	1.4	1.1	<0.01	18

転写因子 AP-4 による HIV 発現抑制機構

分担研究者：岡本 尚（名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学）

研究要旨

HIV LTR の TATA box 近傍に転写因子 AP-4 の結合サイトが存在し、AP-4 が HIV 発現の抑制因子として機能していることを見出した。AP-4 は TATA box をマスキングすることによって TBP の結合を阻害するとともに、HDAC を LTR にリクルートすることによって HIV の転写を抑制していた。HIV 慢性潜伏感染細胞を用いた実験においても AP-4 による TBP の排除と LTR への HDAC のリクルートが確認でき、AP-4 が HIV の潜伏感染維持に関わっていることが推察された。

A. 研究目的

転写因子 AP-4 は 15 年程前に Tjian らによって SV40 late gene を活性化する因子として見つかった bHLH-Zip 型の転写因子である。その後の研究で、TGF- $\beta$  や caspase 9, angiotensinogen などの遺伝子プロモーターに AP-4 の結合サイトが存在することが報告されたが、詳細な制御機構については不明である。昨年私どもは、Tat が DNA 修復酵素である OGG1 を誘導すること、その過程において AP-4 が OGG1 の発現を負に制御しており、Tat が OGG1 promoter から AP-4 を排除する事によって OGG1 の発現を誘導していることを示した。その後の研究で、HIV LTR の TATA box 近傍に AP-4 の結合サイトが存在すること、種々の HIV サブタイプにおいて AP-4 の結合サイトがよく保存されていることに着目した。そこで、HIV 発現に対する AP-4 の作用を検討した結果、AP-4 が HIV 発現の抑制因子として機能していることが明らかとなった。

（倫理面への配慮）

本研究には該当せず。

B. 方法と結果

(1) AP-4 は HIV の転写を抑制する

種々の HIV サブタイプの LTR を比較したところ、TATA box 近傍に存在する AP-4 の結合配列が良く保存されていることがわかった。そこで、AP-4 が HIV の転写に及ぼす影響を T および単球系細胞を用いて luciferase assay にて調べた。その結果、AP-4 は basal レベルでの転写と Tat や TNF- $\alpha$  による HIV の転写活性化を強く抑制した。一方、AP-4 の結合サイトを変異させた変異型 LTR においては AP-4 による抑制効果が認められなかった。内在性の AP-4 が実際に HIV 転写の抑制因子として機能しているか否かを調べるために、AP-4 に対する siRNA を細胞に導入し luciferase assay を行った。その結果、AP-4 の発現をノックダウンした細胞では、HIV の転写活性が逆に上昇した。以上の結果から、AP-4 は HIV 転写の抑制因子として機能している事が明らかとなった。さらに、抑制作用に関わる機能ドメインを同定するために種々の変異型 AP-4 を作製し検討した結果、この抑制作用には AP-4 の DNA 結合ドメインが必須であった。

(2) AP-4 は TBP の TATA box への結合を阻害する。

AP-4 がどのような機構で HIV の転写を

抑制しているか解析を進めた。AP-4 の結合サイトが TATA box の近傍に存在することから、AP-4 が TBP の TATA box への結合を阻害していることが推察された。この点を AP-4 の組み替え蛋白を作製し EMSA にて検討した。その結果、AP-4 は TBP の TATA box への結合を濃度依存的に抑制した。AP-4 と TBP の拮抗作用は *in vivo* においても確認でき、AP-4 による HIV の転写阻害作用は TBP の強制発現によって解除された。

### (3) AP-4 は HDAC と結合する

AP-4 による HIV 転写の阻害効果が TATA box のマスキングのみによるのか否かを調べるために、本来の AP-4 サイトを変異させ、TATA box から様々な距離の所に AP-4 サイトを導入した変異型 LTR を作製し luciferase assay にて検討した。その結果、TATA box から AP-4 サイトを遠ざけた変異型 LTR においても、野生型の LTR にはおとるものの AP-4 の阻害作用が認められた。この結果から、AP-4 による抑制作用として TATA box のマスキング以外の抑制メカニズムが推察された。近年、転写の抑制機構において HDAC が重要な役割を演じていることが報告されている。そこで、AP-4 による HIV 転写抑制機構において HDAC が関与しているか否か検討した。始めに、AP-4 と HDAC が相互作用するか否かを IP-WB 法にて検討した結果、AP-4 は内在性の HDAC1、2 と結合した。また、*in vitro* の結合実験の結果から、AP-4 と HDAC1 は直接結合していることが解った。AP-4 による HIV の転写阻害作用に実際に HDAC が関与しているか否かを HDAC の阻害剤である TSA を用いて検討した。その結果、TSA は AP-4 による HIV の転写阻害を解除した。

### (4) HIV 慢性潜伏感染細胞 LTR 上において、AP-4 は TBP の結合を阻害するとともに HDAC をリクルートする。

HIV の慢性潜伏感染細胞である ACH2 と U1 細胞の LTR を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP) assay を行い、実際の HIV 感染細胞内での標的 DNA 上での AP-4 と TBP、HDAC の動態を検討した。その結果、未刺激状態での HIV 感染細胞内 LTR 上においては恒常的な AP-4 と HDAC の結合が認められた。一方、TNF- $\alpha$  で細胞を刺激すると、LTR から AP-4 と HDAC が遊離し、逆に TBP と pol II が LTR にリクルートされてくること、さらにヒストンのアセチル化がおこなわれていることが認められた。AP-4 の結合サイトを変異させた LTR を細胞に導入した実験においては、AP-4 の LTR への結合とともに HDAC の結合も認められなかったため、HDAC は AP-4 によって LTR にリクルートされていることが明らかとなった。

### (5) AP-4 は HIV の複製を抑制する。

最後に HIV 複製に対する AP-4 の効果を検討するために、Jurkat T 細胞に NL4-3 を導入し p24 ELISA assay を行った。その結果、AP-4 は HIV の複製を抑制した。この効果が AP-4 によるものか否かを確認するために、AP-4 サイトを変異させた NL4-3 を作製し実験を行った結果、変異型 NL4-3 においては AP-4 による HIV 複製の抑制効果が認められなかった(図1)。さらに、AP-4 siRNA を細胞に導入すると HIV の複製は上昇した事からも、AP-4 は HIV 複製を負に制御している転写因子であることが明らかとなった。

### C. 考察

AP-4 の結合サイトが LTR の TATA box 近傍に存在し、AP-4 が TATA box のマスキングと HDAC のリクルートによって HIV の転写を負に制御していることが明らかとなった。HIV 慢性感染細胞において、未刺激の状態では AP-4 が TATA box をマスキングすると同時に HDAC を LTR にリクルートしていること、

TNF- $\alpha$ の刺激が入ると AP-4 が LTR から遊離し代わりに TBP と pol II が LTR にリクルートされた。以上のことから、AP-4 の動態が HIV の潜伏感染維持に重要な役割を担っている可能性が推察された(図2)。また、これまでに AP-4 によって発現が制御される遺伝子がいくつか報告されているが、そのメカニズムについては不明であった。今回の研究成果は、AP-4 による遺伝子発現制御のメカニズムの一端を解明できたと考える。

#### D. 結論

AP-4 が HIV の発現において内在性の抑制因子として機能していることが明らかとなった

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Tozawa, K., Okamoto, T., Kawai, N., Hashimoto, Y., Nagata, D., Hayashi, Y., and Kohri, K.: Positive correlation between sialyl Lewis X expression and pathological findings in renal cell carcinoma. *Kidney Int.* 67:1391-1396, 2005
- 2) Sanda, T., Iida, S., Ogura, H., Asamitsu, K., Murata, T., Bacon, K.B. Ueda R., and Okamoto, T.: Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I $\kappa$ B kinase inhibitor. *Clin. Can. Res.* 11:1974-1982, 2005
- 3) Kobayashi, S., Kajino S., Takahashi, N., Kanazawa, S., Imai, K., Hibi, Y., Ohara, H., Itoh M. and Okamoto, T. : 53BP2 induces apoptosis through the mitochondrial death pathway. *Genes Cells* 10:253-260, 2005
- 4) Ota, S., Kanazawa, S., Kobayashi M., Otsuka T. and Okamoto, T.: Establishment of a simple and quantitative immunospot assay for detecting anti-type II collagen antibody using infrared fluorescence imaging system (IFIS). *J. Immunol. Methods* 299:189-198, 2005
- 5) Takahashi, N., Kobayashi, S., Kajino, S., Imai, K., Tomodo, K., Shimizu, S., and Okamoto, T.: Inhibition of the 53BP2S-mediated apoptosis by nuclear factor  $\kappa$ B and Bcl-2 family proteins. *Genes Cells.* 10:803-811 2005.
- 6) Imai, K., Nakata, K., Kawai, K., Hamano, T., Mei, N., Kasai, H. and Okamoto, T. :Induction of OGG 1 gene expression by HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* 280:26701-26713, 2005.
- 7) Tanaka, K., Hasegawa, J., Asamitsu, K. and Okamoto, T. :Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoaging by a nuclear factor  $\kappa$ B inhibitor parthenolide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 280:26701-26713, 2005
- 8) Katagiri, D., Hayashi, H., Victoriano, Ann Florence B., Okamoto, T., and Onozaki, K.: Estrogen Stimulates Transcription and Replication of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1). *Int. Immunopharm.*6:170-181, 2006
- 9) Okamoto, T., Sanda, T., and Asamitsu, K. ;NF- $\kappa$ B signaling and carcinogenesis. *Curr. Pharm. Design*, 2006 (in press).
- 10) Sanda, T., Asamitsu, K., Ogura, H., Iida, S., Utsunomiya, A., Ueda, R., and Okamoto, T., : Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I $\kappa$ B kinase inhibitor. *Leukemia*, 2006 (in press)
- 11) Victoriano, A.F.B., Asamitsu, K., Hibi, Y., Imai, K., Barzaga, N.G., and Okamoto, T.: Inhibition of HIV-1 replication in latently

infected cells by a novel I $\kappa$ B kinase inhibitor. *Antimic. Agents Chemoth.* 2006 (in press)

## 2. 学会発表

### 1) Takashi Okamoto:

International Meeting of the Institute of Human Virology 2005年8月29日～9月2日 Baltimore, USA

2) 寺西太、竹山廣光、赤毛義実、金澤智、真辺忠夫、岡本尚：腹膜中皮細胞表面の接着分子ヒアルロン酸が膀胱癌細胞の運動能と浸潤能に及ぼす促進効果と分子標的としての PI3K の役割 第 64 回日本癌学会学術総会 平成 17 年 9 月 14 日～16 日 札幌

3) 高橋なを子、小林真哉、梶野真一、友田圭介、金澤智、今井健一、岡本尚：53BP2 蛋白によるアポトーシスはミトコンドリア経路を介する 第 64 回日本癌学会学術総会 平成 17 年 9 月 14 日～16 日 札幌

4) 三田貴臣、飯田真介、上田龍三、岡本尚：成人 T 細胞白血病に対する新規 IKK 阻害剤の抗腫瘍作用 第 64 回日本癌学会学術総会 平成 17 年 9 月 14 日～16 日 札幌

5) Ann Florence B Victoriano<sup>1,2</sup>, Kaori Asamitsu<sup>1</sup>, Yurina Hibi<sup>1</sup>, Kenichi Imai<sup>1</sup>, Nina G Barzaga<sup>2</sup>, and Takashi

Okamoto<sup>1,\*</sup> : Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Latently Infected Cells by a Novel IKK Inhibitor 第 53 回日本ウイルス学会 平成 17 年 11 月 20 日～22 日 横浜

6) 今井健一 岡本尚：転写因子 AP-4 による HIV 発現抑制機構 第 53 回日本ウイルス学会 平成 17 年 11 月 20 日～22 日 横浜

7) 今井 健一 岡本尚：転写因子 AP-4 による HIV 発現抑制機構 第 19 回日本エイズ学会学術集会・総会 平成 17 年 12 月 1 日～12 月 3 日

8) 今井健一 朝光かおり 石橋高宏 岡本尚：転写因子 AP-4 による HIV 発現抑制機構 第 28 回日本分子生物学会年会 平成 17 年 12 月 7 日～12 月 10 日 福岡

9) Takashi Okamoto : Cytokine Synthesis Inhibitors/Modulators. The 2005 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. 2005 年 12 月 15 日～12 月 20 日 ハワイ

10) Takashi Okamoto : Prevention of the ultraviolet B-mediated skin photoageing by NF $\kappa$ B inhibitors The Program of the V International Symposium on Aesthetic Medicine. 2006 年 2 月 18 日 ロシア

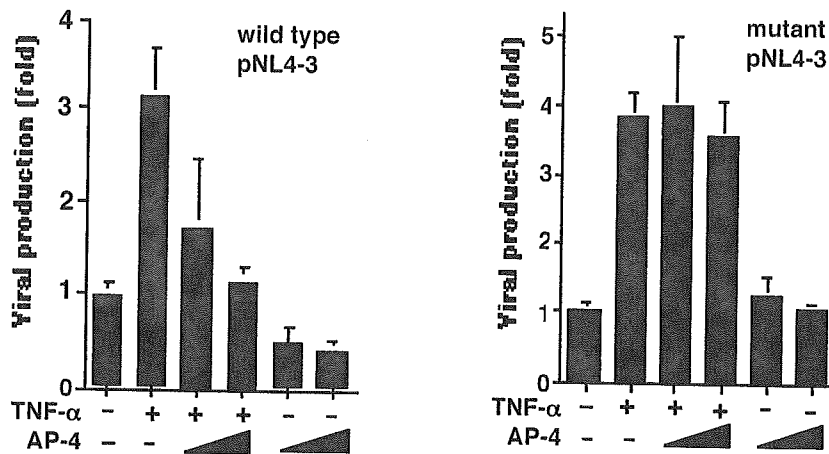


図1. AP-4によるHIVの複製抑制。Jurkat細胞にpNL4-3を導入しp24を測定した結果、AP-4はHIVの複製を抑制した(左図)。AP-4結合サイトを変異させた変異型pNL4-3においてはAP-4による抑制効果が認められなかった(右図)。

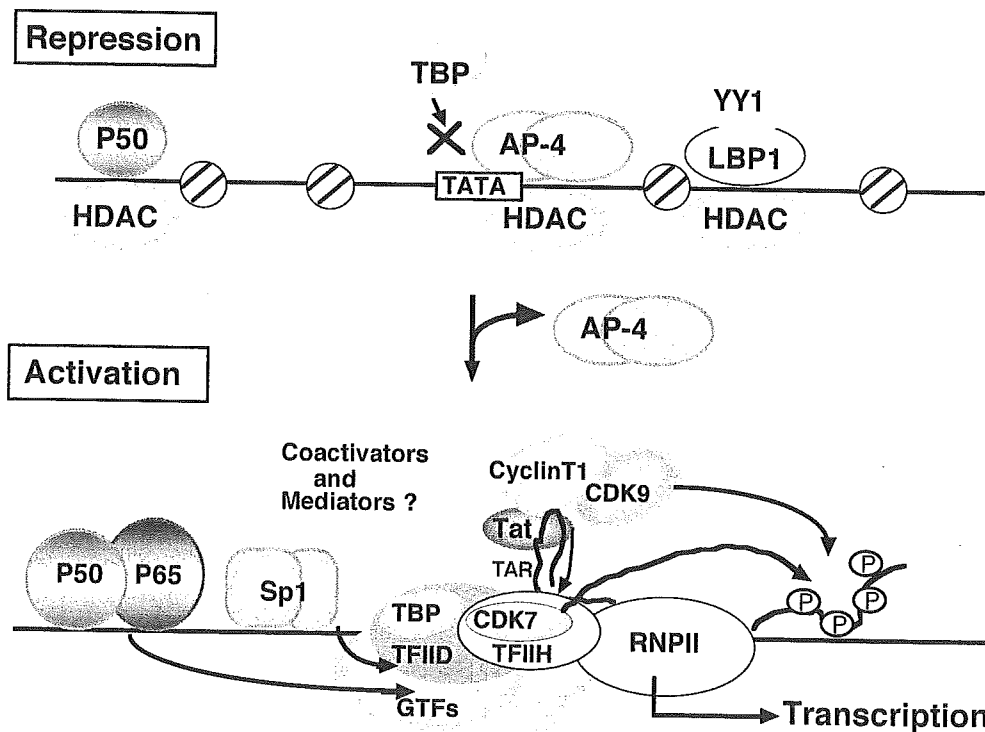


図2. AP-4によるHIV発現抑制機構。未刺激状態の細胞では、NF-κB p50、YY-1がHDACをLTRにリクルーされる。AP-4はTBPの排除とHDACのリクルートにより強かにHIVの発現を負に制御している。TNF-α等の刺激が入るとNF-κB等の活性化の後、クロマチンの修飾がおこり、LTRからAP-4とHDACが遊離する。その後、TBPなどの基本転写因子群が呼び込まれHIVの転写が始まると考えられる。

厚生労働科学研究費補助金 (創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業)  
分担研究報告書

抗エイズ薬開発のためのマウス個体への感染系開発

分担研究者 小糸 厚 熊本大学エイズ学研究センター病態制御分野 助教授

研究要旨

HIV 感受性マウスあるいはラットの作製が試みられたが、十分な HIV 複製は得られず、それを規定している宿主因子群がすべて明らかになっているわけではない。最近、APOBEC3(APO3)が、HIV の感染性を抑制することが報告された。HIV Vif はヒト APO3 にもみ対抗し、マウス由来のものには機能せず、HIV の宿主域がきわめて狭いことの一因となっている可能性がある。本年度はこの HIV に対する自然防御機構がげっ歯類に広く存在するか否かを明らかにするため、ラット由来 APO3 をクローニングし、その活性を検討した。ラット由来 APO3 存在下では HIV の感染性は、Vif 非依存性に著明に低下した。HTLV-I はラット APO3 の抑制活性に対して比較的、抵抗性であった。MuLV に対してはラット APO3 は全く抑制活性を示さなかった。APOBEC を介したレトロウイルス感染制御機構はげっ歯類でも広く保存されているようであるが、MuLV はげっ歯類の deaminase に対して抵抗性のウイルスとして進化してきたと思われる。マウスとラットの分岐後、内因性レトロウイルスなど何らかの選択圧に対してアミノ酸配列の急速な変化が APO3 におこっているが、その機構解明は今後の課題である。

A. 研究目的

HIV 感染症の小動物モデルとして HIV 感受性マウスあるいはラットの作製が試みられてきたが、これまでげっ歯類動物で十分な HIV の複製に成効したとの報告はなく、またそれを規定している宿主因子群がすべてあきらかになっているわけではない。

最近、HIV 粒子に取り込まれたシチジン脱アミノ酵素 APO3 が、逆転写の際 first(minus)-strand DNA に作用し、その感染性を負に制御しうることが明らかにされた。HIV Vif はヒト由来の APO3 に対してのみ対抗し、マウス由来のものには機能せず、HIV 複製の宿主域がきわめて狭いことの一因となっている可能性がある。げっ歯類を感染モデルとするには、

この酵素活性をノックアウトする必要性が示唆されている。

この HIV 複製に対する自然防御機構が霊長類以外の小動物に広く存在するか否かを明らかにすることは、今後の小動物モデル開発にむけて重要であると考えられる。

そこで本年度はこの HIV 複製に対する自然防御機構がげっ歯類に広く存在するか否かを明らかにするため、ラット由来 APO3 をクローニングし、その抗 HIV 活性について検討した。

B. 研究方法

Fisher, SD, Wistar ラット脾臓細胞より APO3 cDNA 全長を PCR で増幅し、塩基配列を決定した。C 端に HA タグを付

加して発現ベクターに組み込み、抗 HIV 活性を解析した。pNL-Luc および pNL-LucΔvif をラット由来 APO3、VSV-G 発現ベクターとともに 293T 細胞にトランスフェクトし、pseudotype virus を得た。293T 細胞に VSV-G/HIV-1 pseudotype を感染させ、ルシフェラーゼ活性により感染性を定量した。また逆転写産物の env 領域を PCR で増幅し、塩基配列を決定、G to A mutation の導入を検討した。さらにラット APO3 の HTLV-I, MuLV の感染性への影響を検討した。

### C. 結果

クローニングしたラット APO3 は、3 種類とも cytidine deaminase に保存されたモチーフを 2 コピー有し、第 5 エクソンが splice out された splice form であった。アミノ酸配列の同一性はマウス APO3 に対して 70%と、げっ歯類間でも高度の多型性を有していることがわかった（マウス/ヒト間の同一性は 30%程度である）。分子系統樹作製の結果、マウスとラットの分岐後、げっ歯類の APO3 は急速にそのアミノ酸配列を変化させてきたこと、またヒト APO3G, 3F, 3B とは均等の距離をとり、現時点で機能不明の APO2 に進化的近縁関係にあることが示唆された。HIV 粒子の感染性は、ラット由来 APO3 存在下では著明(100 分の 1 以下)に低下した。また Vif による阻害をうけないことが確認された。いずれのウイルス DNA にも G to A hypermutation の導入が高頻度に確認され、deaminase 活性の存在が示唆された。HTLV-I はラット APO3 の抑制活性に対して比較的、抵抗性であった。MuLV に対してはラット APO3 は全く抑制活性を示さなかった。(Koito A et al., 論文投稿準備中)。

### D. 考察

本研究により、ラット由来 APO3 にも強力な抗 HIV 活性が存在することが明らかとなり、APOBEC を介したレトロウイルス感染制御機構はげっ歯類でも広く保存されている可能性が示唆された。ヒト APO3 が HIV のみならず MuLV の感染も抑制することが報告されているが、ラット APO3 はマウス-ラット間の MuLV の伝播にバリアーとして機能しないことが示された。ラット細胞で MuLV が効率に増殖する事実とも一致し、MuLV はげっ歯類の APOBEC に対して抵抗性のウイルスとして進化してきたと思われる。マウスとラットの分岐後 1,600 万年の間に APO3 配列には何らかの選択圧に対して net charge の変化を伴うアミノ酸配列の急速な変化がおこっているが、その機構は不明である。マウス、ラットのゲノムの 10%近くは内在性レトロウイルスにより占められるが、その多くは転位能を失っている。マウスの IAP や MusD 配列の一部には転位活性が証明され、そのレトロトランスポジションは APO3 で阻害されるという。哺乳類のゲノムサイズの拡大、多様性の獲得に寄与したであろうこれらのレトロエレメントの転位をそれぞれの種の APO3 がコントロールし共進化してきたと考えられる。

### E. 結論

ラット由来 APO3 にも Vif で阻害されない抗 HIV 活性が存在することが明らかとなり、発生工学手法によりげっ歯類を HIV の感染モデルとするための重要な情報が得られた。



F. 研究発表

1) 論文発表

1. Nobumoto Watanabe, Yoshifumi Nishihara, Tomoyuki Yamaguchi, Atsushi Koito, Hiroyuki Miyoshi, Hideaki Kakeya, and Hiroyuki Osada.: Fumagillin suppresses HIV-1 infection of macrophage through the inhibition of Vpr activity. *FEBS Lett.* (In press)
2. Takeo Ohsugi, and Atsushi Koito.: Resistance of human T-cell leukemia virus type 1 to the antiviral effects of APOBEC3G. *J. Infect. Des.* (Submitted)

2) 学会発表

1. Matsushita S, Honda A, Koito A, Yoshimura K: Long-term follow-up study for the change of the reservoir for HIV-1 on highly active antiretroviral therapy. 7th ICAAP, Kobe, Japan, July 1-5, 2005.
2. Yoshimura K, Honda A, Kenai A, Shibata J, Koito A, Matsushita S.: Proviral DNA and turnover levels in aviremic long-term non-progressors (LTNPs); a temporary goal for patients under HAART. 7th ICAAP, Kobe, Japan, July 1-5, 2005.
3. 小糸 厚 : げっ歯類由来 APOBEC3 の抗 HIV 感染阻害効果、第 6 回熊本エイズセミナー、阿蘇、平成 17 年 9 月 15 日～16 日.
4. Shibata J, Yoshimura K, Maeda Y, Murakami T, Eda Y, Koito A, Matsushita S.: In vitro induction of human immunodeficiency virus type 1 variants resistant to a novel broad neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD247. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.
5. Ikeda T, Shibata J, Honda A, Yoshimura K, Koito A, Matsushita S.: Relationship of residual HIV-1 and the integration sites in patients on prolonged and effective HAART. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.
6. Yoshimura K, Shibata J, Ikeda T, Honda A, Koito A, Matsushita S.: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.
7. Matsushita S, Shibata J, Yoshimura K, Maeda Y, Murakami T, Koito A, Honda M, Mitsuya H, Eda Y.: Development of broadly reactive neutralizing monoclonal antibody KD247: implication for passive immunotherapy. The cooperative research project on clinical and epidemiological studies of emerging and re-emerging infectious diseases, Aso, Japan, Sep. 15-16, 2005.
8. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、江田康幸、小糸 厚、松下修三 : 広範囲 HIV-1 単クローン抗体の in vitro 逃避ウイルスの誘導と解析. 第 8 回白馬シンポジウム in 鹿児島-エイズ治療の最前線-.鹿児島、平成 17 年 11 月 3 日～4 日.
9. 小糸 厚、柴田潤二、大杉剛生 : げっ

- 歯類由来 APOBEC3 の抗 HIV 感染阻害効果、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 20 日～22 日.
10. 大杉剛生、小糸 厚：APOBEC3G の HTLV-I ウイルス粒子への取り込みと感染性への影響、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 20 日～22 日.
  11. 柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三：ヒト免疫不全ウイルス 1 型 gp120 の C3 領域変異による抗 V3 中和抗体に対する中和抵抗性の獲得、第 53 回日本ウイルス学会総会、横浜、平成 17 年 11 月 20 日～22 日.
  12. 小糸 厚、柴田潤二、大杉剛生：ラット由来 APOBEC3G のレトロウイルス感染阻害効果、第 19 回日本エイズ学会、熊本、平成 17 年 12 月 1 日～3 日.
  13. 池田輝政、柴田潤二、吉村和久、小糸 厚、松下修三：長期間 HAART 有効症例における残存 HIV と integration site の関連性、第 19 回日本エイズ学会、熊本、平成 17 年 12 月 1 日～3 日.
  14. 柴田潤二、吉村和久、前田洋助、村上利夫、小糸 厚、松下修三：広範囲 HIV-1 中和単クローン抗体の *in vitro* 逃避ウイルスの誘導と解析、第 19 回日本エイズ学会、熊本、平成 17 年 12 月 1 日～3 日.
  15. 吉村和久、柴田潤二、池田輝政、高濱宗一郎、松永雄亮、小糸 厚、松下修三：HAART により長期間ウイルスが抑制された症例の pDNA の推移、第 19 回日本エイズ学会、熊本、平成 17 年 12 月 1 日～3 日.
  16. Matsushita S, Honda A, Shibata J, Kimura T, Ikeda T, Koito A, Yoshimura K: HIV-1 proviral DNA dynamics in patients with long-term successful HAART. 2<sup>nd</sup> International Workshop on HIV Persistence during Therapy. Saint Martin. FWI, Dec. 6-9, 2005.
  17. Shibata J, Yoshimura K, Honda A, Murakami T, Koito A, Matsushita S. A role of mutations in non-V3 envelope regions for escape from a broad neutralizing anti-V3 monoclonal antibody, KD-247, during *in vitro* selection. 4<sup>th</sup> Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, Denver, USA, Feb. 5-8, 2006.
  18. Yoshimura K, Shibata J, Kimura T, Honda A, Maeda Y, Koito A, Murakami T, Mitsuya H, Matsushita S. Resistance profile of a novel broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors *in vitro*. 4<sup>th</sup> Conference on Retrovirus and Opportunistic Infections, Denver, USA, Feb. 5-8, 2006.

Fig.1

### Intra-species polymorphism of rodent APOBEC3s

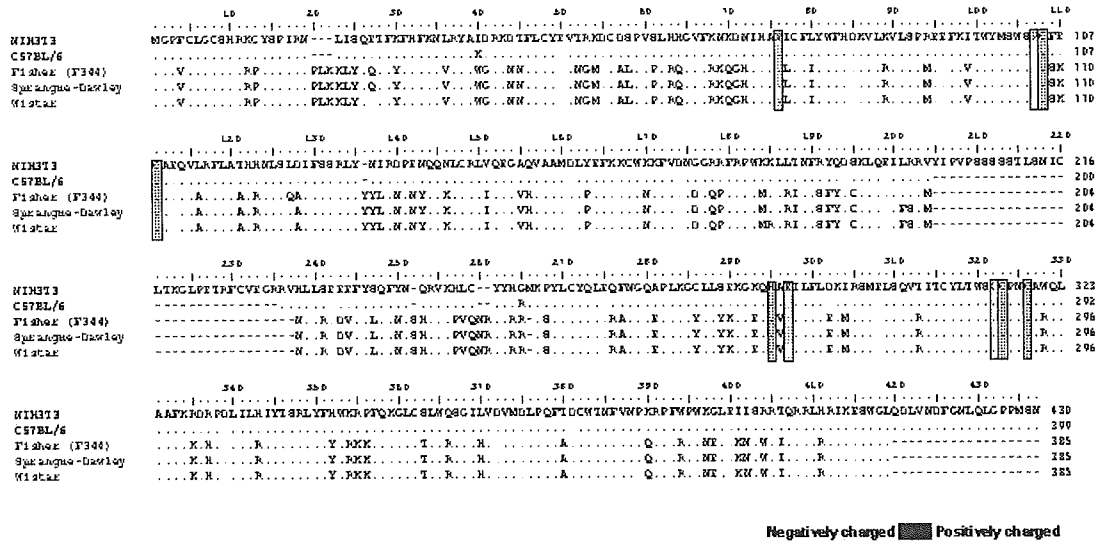
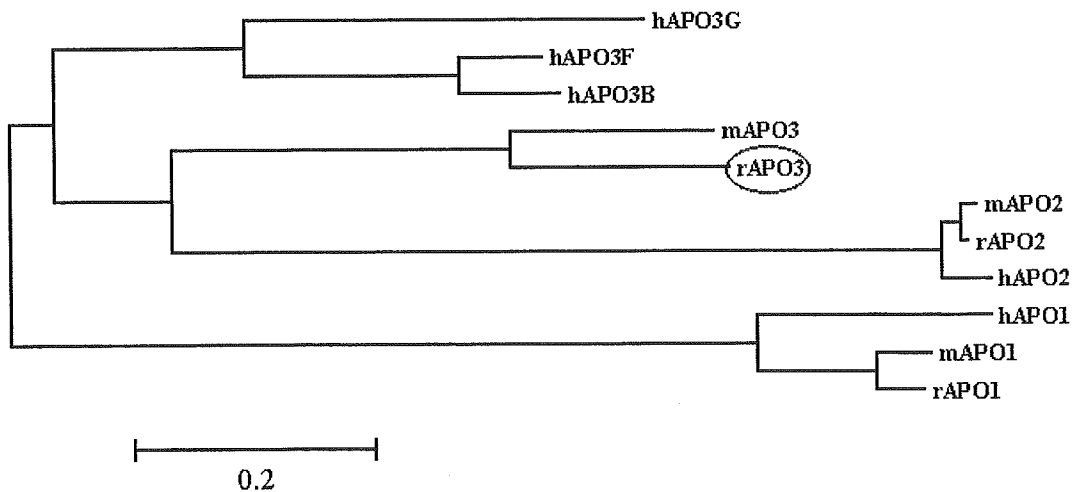


Fig.2

### Phylogenetic tree of APOBEC-family sequences



## 生体分子による HIV 複製抑制

分担研究者：神奈木真理（東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 教授）

### 研究要旨

無症候 HIV-1 感染者の CD8 陽性細胞は HIV-1 複製抑制効果を示す。この抑制効果は CTL による細胞傷害活性とは異なり、液性因子 CAF (CD8+ cell antiviral factor) を介するとする報告もあるが、主に CD8 陽性細胞と感染細胞の接触による。CAF は未だに同定されていない。我々は、この HIV-1 抑制メカニズムを解明する目的で、HIV-1 と無関係の 抗原特異性を持つ CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 株を樹立し、これらが HIV-1 抑制活性を示すことを報告してきた。この抑制活性は細胞傷害活性とは異なり、主に細胞接触依存性に HIV-1 複製を抑制する。ところが、樹立した 4 株の CTL 株のうち一株は細胞上清も HIV-1 抑制活性を示した。我々はこの CTL 上清について、イオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーにより HIV-1 抑制活性のある分画を部分精製した。この分画に含まれる複数の蛋白のうち抑制分画特異的と思われるバンドを SDS ゲルから切り出し、質量分析 (MALDI MS) を行ったところ、マイコプラズマ由来の arginine deiminase と同定された。本酵素は、今後生物学的な抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つ。しかし、細胞接触依存性の HIV-1 抑制は arginine deiminase とは無関係であった。

### A. 研究目的

無症候 HIV-1 キャリアの CD8 陽性細胞が HIV-1 複製を抑制することが知られている。我々の解析ではこの抑制は細胞接触依存性であるが、米国の研究グループは未同定の液性因子 CAF (CD8+ cell antiviral factor) を介すると報告している。我々は、CD8 陽性細胞による HIV-1 抑制機序を解明する目的で HIV-1 抑制効果を示す CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 株を 3 株樹立した。この CTL 株は HIV-1 と無関係の抗原特異性を持ち、HIV-1 抑制は細胞傷害活性とは異なる。3 株とも細胞接触依存性の HIV-1 抑制活性を示したが、1 株だけ

は上清も HIV-1 抑制活性を示した。本年度はこの上清中の液性因子について分離同定を試みた。

### 2. 方法

#### 1) アロ抗原特異的 CD8 陽性 CTL 株：

4 人の健常人末梢血単核球 (PBMC) をマイトマイシン C 処理した Raji 細胞で刺激し、特異的に増殖する細胞群から CD4+細胞を除去し IL-2 依存性の CD8+細胞株を樹立した。この細胞株は Raji 細胞を認識して殺すが自己細胞とは反応しないアロ特異的 CTL であることを確認している。この CTL 株は、IL-2 存在下で培養し定期的に Raji 刺激を加え維持した。

## 2) HIV-1 感染 PBMC に対する HIV-1 抑制活性:

細胞接触を介する抑制活性の検出には、CTL と同一ドナー由来の PHA 刺激 PBMC の CD8+細胞除去分画に 2 時間 HIV-1 感染後、CTL と 4 日間混合培養し上清中 HIV-1 p24 量を ELISA により測定した。細胞上清中の抑制活性の検出には、PHA 刺激 CD4+PBMC に 2 時間 HIV-1 感染させた後、同体積の CTL 上清を加え 4 日後の HIV-1 p24 量を測定した。HPLC 分画を抑制実験に用いる場合は、総体積が元の上清とほぼ同じになるよう濃縮し透析した。

## 3) CTL 培養上清の分画精製:

CTL 培養上清は、CTL を抗原刺激後 IL-2 存在下に 48 時間培養し、遠心した上清を 0.25 $\mu$ m フィルターを通したものをを用いた。HPLC を用いて上清をイオン交換クロマトグラフィーにより分画し、それぞれの分画を HIV-1 抑制活性でスクリーニングし活性のピーク付近の分画を濃縮した。これをさらにゲル濾過クロマトグラフィーにより分画し HIV-1 抑制活性のピーク分画を取った。

## 4) CTL 由来蛋白のプロテオーム解析:

HPLC で精製した CTL 上清中の HIV-1 抑制分画を、SDS-PAGE で展開し銀染色した後、コントロール上清を同様に精製した分画には無い蛋白バンドをゲルから切り出し、質量分析 (トリプシン消化、MALDI-MS) を行った。

## 3. 結果

4 株のアロ特異的 CD8 陽性 CTL 株は全て、HIV-1 感染させた自己 CD4 陽性との共培養により HIV-1 複製抑制活性を示した。これらの CTL 株のうち、CTL-3 株の上清は HIV-1 の複製を著明に抑制したが、他の 3 株の上清にはこのような活性は認められなかつた。

昨年度の予備実験から、活性の存在する分画には牛血清由来の蛋白も混在するため、培地や添加物から極力牛血清を除いた条件で CTL-3 培養上清を調整した。上清をイオン交換クロマトグラフィーで分画すると 26 番目を中心とする fraction に繰り返し HIV-1 抑制活性が認められた。もっとも活性の強い #26 分画を濃縮・透析し、さらにゲル濾過で #14-#15 の分画に HIV-1 抑制活性が認められた。

この部分精製分画を SDS-PAGE で展開したところ、未だ複数のバンドが認められたが、抑制活性の無い CTL 上清あるいは MMC 処理した Raji のみの培養上清を同様に精製した分画と比較し、CTL-3 に特異的と思われるバンドを切り出した。このバンドから抽出した蛋白をトリプシン消化し、質量分析 (トリプシン消化、MALDI-MS) を行ったところ、この蛋白は *Mycoplasma arginini* 由来の arginine deiminase (分子量 46kD) と同定された。

抗マイコプラズマ剤 MC210 を添加し細胞株を 2 週間培養したところ、上清中の HIV-1 抑制活性は消失した。しかし、CTL 株と自己感染細胞との共培養による HIV-1 抑制活性は温存された。

## 4. 考察

散発的に CTL 上清に認められた HIV-1 抑制効果は、培養中に混在した *Mycoplasma* 由来の arginine deiminase の効果と考えられた。CAF は標品が無いため比較できない。

抗マイコプラズマ剤により CTL 上清の HIV-1 抑制効果は消失したが、CTL の細胞接触依存性の HIV-1 抑制効果は温存された。従って、細胞接触依

存性の HIV-1 抑制効果はマイコプラズマとは無関係の別の機序によるものと考えられ、さらに解析が必要である。

Arginine はヒトでは必須アミノ酸ではなく正常細胞は合成できるが、悪性腫瘍の中には arginine 依存性のものがあり、Arginine deiminase これらの腫瘍に対する抗がん剤として臨床応用が試みられている。本研究結果から、本酵素抗 HIV-1 剤としての応用可能性も示された。

## 5. 結論

Mycoplasma 由来の arginine deiminase は HIV-1 抑制効果を持つ。

健康人由来 CD8 陽性 CTL は細胞接触依存性に HIV-1 抑制効果を示し、これは arginine deiminase と無関係であった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- i) Kubo, M., Nishitsuji, H., Kurihara, K., Hayashi, T., Masuda, T., and Kannagi, M.: Suppression of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by arginine deiminase of Mycoplasma arginini. J. Gen. Virol. 2006, in press.
- ii) 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. 2005, 79, 10088-10092.
- iii) 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 2005, 114, 257-267.

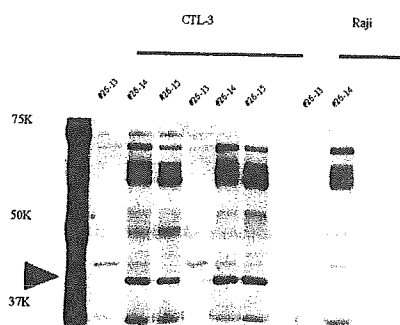
- iv) Kannagi, M., Harashima, N., Kurihara, K., Ohashi, T., Utsunomiya, A., Tanosaki, R., Masuda, M., Tomonaga, M., and Okamura, J.: Tumor immunity against adult T-cell leukemia. Cancer Sci. 2005, 96, 249-255.
- v) X. Zhou, M. Kubo, H. Nishitsuji, K. Kurihara, T. Ikeda, T. Ohashi, M. Azuma, T. Masuda, and M. Kannagi: Inducible co-stimulator (ICOS)-mediated suppression of human immunodeficiency virus type 1-replication in CD4+ T lymphocytes. Virol. 325: 252-263, 2004.

### 2. 学会発表

- i) M. Kannagi, X. Zhou, M. Kubo, H. Nishitsuji, K. Kurihara, T. Ikeda, T. Ohashi, M. Azuma, T. Masuda. Suppression of HIV-1-replication by inducible co-stimulator (ICOS)-ligands. 7<sup>th</sup> ICAAP (International Congress on AIDS in Asia and the Pacific), July, 2005, Kobe.
- ii) M. Kubo, H. Nishitsuji, K. Kurihara, T. Hayashi, T. Masuda, and M. Kannagi. Anti- HIV-1 factor(s) derived from HIV-1-irrelevant CD8+ cytotoxic T lymphocytes. 7<sup>th</sup> ICAAP (International Congress on AIDS in Asia and the Pacific), July, 2005, Kobe.
- iii) M. Kannagi. A Crossing of Infection and Tumor Immunity against Adult T-cell Leukemia. Japan-US collaborative meeting for cancer immunosurveillance and cancer vaccine clinical trials. August 19. 2005, Sapporo.
- iv) 増田貴夫、西辻裕紀、濱本誠二、小櫃冴美、神奈木真理. HIV-1 インテグラーゼ結合因子 Gemin2 のウイルス複製における機能的関与。第 53 回日本ウイルス学会シンポジウム、横浜、2005 年 11 月。
- v) 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、横浜、2005 年 11 月.
- vi) 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、横浜、2005 年 11 月.
- vii) 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、横浜、2005 年 11 月.
- viii) 増田貴夫、西辻裕紀、濱本誠二、小櫃冴美、神奈木真理. 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、熊本、2005 年 12 月
- ix) 久保誠、西辻裕紀、栗原清、林隆也、増田貴夫、神奈木真理. HIV 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、熊本、2005 年 12 月.
- x) 西辻裕紀、久保誠、林隆也、神奈木真理、池田たま子、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、熊本、2005 年 12 月.
- xi) 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、熊本、2005 年 12 月.
- xii) 1. 神奈木真理. 成人 T 細胞白血病の発症予防と免疫治療の展望. 第 19 回日本エイズ学会シンポジウム、H17 年 12 月、熊本.
- xiii) 原嶋奈々江、栗原清、清水由紀子、神奈木真理. 同種造血幹細胞移植後の ATL 患者における CTL メジャーエピトープ. 第 64 回日本癌学会、H17 年 9 月、札幌
- xiv) 栗原清、原嶋奈々江、神奈木真理. リコンビナント Tax 蛋白を用いた HTLV-I 特異的 T 細胞応答の検出. 第 64 回日本癌学会、H17 年 9 月、札幌
- xv) 小森一哉、長谷川温彦、栗原清、原嶋奈々江、神奈木真理. HTLV-I 経口感染ラットにおける HTLV-I 特異的免疫応答制御とその回復. 第 64 回日本癌学会、H17 年 9 月、札幌
- xvi) 神奈木真理、原嶋奈々江、田野崎隆二、清水由紀子、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、H17 年 11 月、横浜

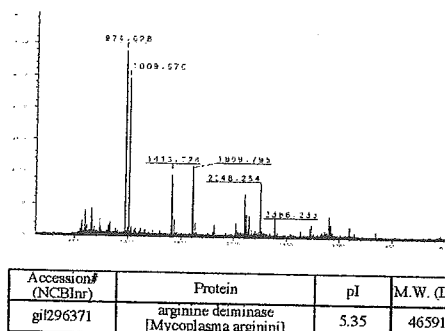
図 1



CTL-3 培養上清の HPLC 部分精製分画の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像 HIV-1 複製抑制

CTL-3 培養上清 (2 サンプル) および MMC-処理 Raji 細胞培養上清をイオン交換とゲルろ過クロマトグラフィーで分取した #26-13, #26-14, #26-15 分画を SDS-PAGE で展開し銀染色した。矢印は CTL-3 に特異的なバンドを示す。このバンドを切り出して質量分析を行った。

図 2



CTL-3 培養上清由来の #26-14 分画から切り出したバンドの質量分析結果

CTL-3 培養上清由来の #26-14 分画から切り出したバンドに含まれる蛋白をリシン分解酵素で処理した後 MALDI-TOF-MS を行った。MS スペクトルパターンを NCBIInr database から MASCOT software を用いて検索したところ、*Mycoplasma arginini* 由来の arginine deiminase と同定された。



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tanabe, M., Matsumoto, T., Shibuya, K., Tateda, K., Miyazaki, S., Nakane, A., <u>Iwakura, Y.</u> , and Yamaguchi, K.	Compensatory response of IL-1 gene knockout mice after pulmonary infection with <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	J. Med. Microbiol.	54	7-13	2005
Wakabayashi, T., Hu, D. L., Tagawa, Y, Sekikawa, K., <u>Iwakura, Y.</u> , Hanada, K., and Nakane, A.	IFN- $\gamma$ and TNF- $\alpha$ are involved in urushiol-induced contact hypersensitivity in mice.	Immunol. Cell. Biol.	83	18-24	2005
Kohu, K., Sato, T., Ohno, S., Hayashi, K., Uchino, R., Abe, N., Nakazato, M., Yoshida, N., Kikuchi, T., <u>Iwakura, Y.</u> , Inoue, Y., Watanabe, T., Habu, S., and Satake, M.	Over-expression of the Runx3 transcription factor increases the proportion of mature thymocytes of the CD8 single positive lineage.	J. Immunol.	174	2627-36	2005
Isoda K, Sawada S, Ayaori M, Matsuki T, Horai R, Kagata Y, Miyazaki K, Kusuhara M, Okazaki M, Matsubara O, <u>Iwakura Y</u> , Ohsuzu F.	Deficiency of interleukin-1 receptor antagonist deteriorates fatty-liver and cholesterol metabolism in hypercholesterolemic mice.	J. Biol. Chem.	280	7002-09	2005
Shinohara, H., Inoue, A., Toyama-Sorimachi, N., Nagai, Y., Yasuda, T., Suzuki, H., Horai, R., <u>Iwakura, Y.</u> , Yamamoto, T., Karasuyama, H., Miyake, K., and Yamanashi, Y.	Dok-1 and Dok-2 are negative regulators of lipopolysaccharide-induced signaling.	J. Exp. Med.	201	333-39	2005
Horino. T., Matsumoto, T., Uramatsu, M., Tanabe, M., Tateda, K., Miyazaki, S., Nakane, A., <u>Iwakura, Y.</u> , and Yamaguchi, K.	Interleukin-1-deficient mice exhibit high sensitivity to gut-derived sepsis caused by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Cytokine	30	339-46	2005
Matsuki, T., Isoda, K., Horai, R., Nakajima, A., Aizawa, Y., Suzuki, K., Ohsuzu, F., and <u>Iwakura, Y.</u>	Involvement of TNF $\alpha$ in the development of T cell-dependent aortitis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice.	Circulation	112	1323-31	2005
Zhou, F., He, X., <u>Iwakura, Y.</u> , Horai, R., and Stuart, J. M.	Arthritis in mice that are deficient in IL-1 receptor antagonist is dependent on genetic background.	Arth. Rheum.	52	3731-38	2005

Kotani, M., Hirata, K., Ogawa, S., Habiro, K., Araki, M., Ishi, T., Ishida, Y., Tanuma, S., Tanabe, K., Toma, Horai, R., <u>Iwakura, Y.</u> , and Abe, R.	Presence of CD28-dependent and independent pathways in autoimmune arthritis developed in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice.	Arth. Rheum.	54	473-81	2006
Deng, X., Yu, Z., Funayama, H., Shoji, N., Sasano, T., <u>Iwakura, Y.</u> , Sugawara, S., and Endo, Y.	Mutual augmentation of the induction of the histamine-forming enzyme, histidine decarboxylase, between alendronate and immuno-stimulants (IL-1, TNF, and LPS), and its prevention by clodronate.	Toxicol. Appl. Pharmacol.	In press		2006
Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., and <u>Iwakura, Y.</u>	Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1 receptor antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.	Int. Immunol.	18	399-407	2006
Ishigame, H., Nakajima, A., Saijo, S., Komiyama, Y., Mastuki, T., Nakae, S., Horai, R., Kakuta, S., and <u>Iwakura, Y.</u>	The role of TNF $\alpha$ and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice.	Ernst Schering Res. Found. Workshop	56	129-53	2006

## 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kidokoro, M, Tashiro, M, and <u>Shida H.</u> :	Genetically stable and fully effective smallpox vaccine strain constructed from highly attenuated vaccinia LC16m8.	Proc. Natl. Acad. Sci	102	4152- 4157	2005
Zhang, X, Hakata, Y, Tanaka, Y, and <u>Shida H.</u>	CRM1, an RNA transporter, is a major species-specific restriction factor of human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) in rat cells. Microbes and Infection.	Microbes and Infection	In press		2006

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakata H., Maeda K., Miyakawa T., Shibayama S., Matsuo M., Takaoka Y., Ito M., <u>Koyanagi Y.</u> , and Mitsuya H.	Potent Anti-R5-human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/ GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin 2 receptor $\gamma$ -chain-knocked-out AIDS mouse model.	J. Virol.	79	2087-2096	2005
Miura Y., and <u>Koyanagi Y.</u>	Death ligand-mediated apoptosis in HIV infection.	Rev. Med. Virol	15	169-178	2005
Matsuura-Sawada R., Murakami T., Ozawa Y., Nabeshima H., Akahira J., Sato Y., <u>Koyanagi Y.</u> , Ito M., Terada Y., and Okamura K.	Reproduction of menstrual changes in transplanted human endometrial tissue.	Hum. Reprod.	20	1477-1484	2005
Ohkura S., Yamashita M., Ishida T., Babu P.G., <u>Koyanagi Y.</u> , 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	21	325-330	2005
Baba S., Takahashi K., Noguchi S., Takaku H., <u>Koyanagi Y.</u> , Yamamoto N., and Kawai G.	Solution RNA structures of the HIV-1 dimerization initiation site in the kissing-loop and extended-duplex dimmers.	J. Biochem.	138	583-592	2005
Munakata Y., Saito-Ito T., Kumura-Ishii K., Huang J., Kodera T., Ishii T., Hirabayashi Y., <u>Koyanagi Y.</u> , and Sasaki T.	Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection.	Blood	106	3449-3456	2005