

転写因子 AP-4 による細胞への HIV 潜伏感染の維持

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）

共同研究者：今井健一（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： 宿主転写因子 AP-4 は HIV 複製を転写レベルで負に制御し、細胞内に潜伏感染しているプロウイルスからのウイルス複製を抑えることによってその維持に重要な役割を演じている。AP-4 結合配列は LTR 領域内の TATA ボックスのすぐ下流に位置し、AP-4 結合配列は種々の HIV-1 株の中でもよく保存されている。本研究では、AP-4 が TBP の TATA ボックスへの結合を抑制し、さらに AP-4 が転写コレプレッサーである HDAC1 を HIV-1 LTR にリクルートすることによって HIV 転写を抑制していることを初めて明らかにした。

（本研究内容は Imai, K. and Okamoto, T.: J. Biol. Chem., 281: 12495-12506, 2006. に発表。）

A. 研究目的

エイズウイルスにおけるウイルス遺伝情報量の増大過程はプロウイルスからの転写の過程であり、ウイルスの複製が宿主転写制御機構に大きく依存する。プロウイルス DNA 合成の際に逆転写の過程でゲノム RNA が RNase H によって分解されるため、ここでは遺伝情報量の増大はおこらない。また、これまでの研究から、潜伏感染細胞からのウイルス複製の活性化には、宿主細胞の転写活性化因子 NF- κ B とウイルスの持つトランス活性化因子 Tat によって段階的に制御されていることが明らかとなった。NF- κ B をはじめとする DNA 結合性転写活性化因子の LTR への結合は、コアクチベーターの作用によるヒストンアセチル化に伴うクロマチン構造の弛緩と TBP (TFIID) 等の基本転写因子や RNA polymerase II のリクルートメントを促す。他方、Tat は転写の始まったばかりの mRNA の TAR 領域に特異的に結合し、転写伸長促進因子である P-TEFb を特異的にリクルートすることにより HIV プロウイルスの転写を著しく上昇させる。

このように HIV の転写活性化機構が、転写因子レベル、あるいはクロマチンレベルで明らかとなった一方で、HIV 転写の抑制メカニズムに関しては不明な点が多い。このメカニズムが明らかとなれば、潜伏感染維持機構の解明へとつながることが期待できる。HIV 転写抑制機構に

関しては、これまでに転写因子 YY-1 が HDAC を LTR にリクルートすることによりヒストンの脱アセチル化をひきおこしクロマチンレベルで HIV の転写を抑制していることが報告されている。また、LTR 上の negative regulatory element (NRE) に結合する転写因子が HIV の転写を抑制するという報告があるが、転写因子結合後の詳しい分子機構はわかっていない。筆者らは、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いだした。

筆者らは、まず遺伝子発現プロファイル解析で Tat 被制御遺伝子を検索した結果、DNA 修復酵素である OGG1 が Tat によって誘導されることを見いだした (Imai et al., J. Biol. Chem. 280: 26701-26713, 2005)。さらに Tat による詳細な OGG1 遺伝子発現の誘導機構を解析したところ、AP-4 が OGG1 の発現を負に制御しており、Tat は AP-4 と結合してその作用を抑制することで OGG1 の転写を誘導していることを見いだした。その後の解析で、HIV LTR の TATA box 近傍 (-22~-17) に AP-4 の結合サイトが存在すること、さらに種々の HIV サブタイプ LTR の AP-4 結合サイトを調べた結果、サブタイプ B、A、C 等多くのサブタイプで AP-4 の結合配列 (CAGCTG) が良く保存されていることに着目した。

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 HLH-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 の結合部位が存在することが報告されたが、相互作用因子をはじめ詳細な遺伝子発現制御機構については一切報告がない。AP-4 結合サイトが LTR TATA box 近傍に存在し、またその配列が良く保存されていることから、AP-4 が HIV の転写において何らかの作用を及ぼしている可能性が推察された。そこでこの点を追求した。

(倫理面への配慮)

本研究には該当せず。

B. 材料と方法

- 1) 細胞株とその培養：HIV 非感染細胞株 CEM, HL-60, Jurkat と HIV 潜伏感染細胞株 ACH2, U1 細胞を用いた。これらの培養は通常の方法で行い、HIV 潜伏感染を維持するために 20 μ M の AZT を培地に加えた。また、ヒト腎由来繊維芽細胞 293 細胞株も使用した。
- 2) プラスミッド：AP-4 cDNA と Myc タグを発現する pMyc-AP-4 を作成した。pCMV-Tat と pNL4-3 はそれぞれ Tat 発現および HIV のフルサイズゲノムを含むプラスミッドである。TBP を発現する pCMV-TBP は千葉大の田村教授より供与された。その他、種々の AP-4 変異体発現プラスミッドを新たに作成した。HIV-1 LTR の制御下に luciferase 遺伝子を発現する CD12-luc は以前の報告にあるものを用いた。その AP-4 部位に変異を加えた種々のプラスミッドを新たに site-directed mutagenesis 法で作成した。これらの塩基配列を定法で決定した。
- 3) 組み換え蛋白とその精製：GST 融合 AP-4 蛋白を産生する pGEX-AP-4 プラスミッドを作成し、GST-AP-4 蛋白を大腸菌で産生させ、GSH アガロースカラムで精製した。
- 4) 抗体とウェスタンブロットおよび免疫沈降：AP-4 に対する抗体は家兎に GST-AP-4 蛋白を免役して作成した。ウェスタンブロットは、細胞抽出液を SDS-PAGE で展開後、PVDF 膜に転写し、一次抗体および 2 次抗体を反応させ、SuperSignal (Pierce 社) を用いて蛍光発色によって蛋白バンドを検出した。
- 5) クロマチン免疫沈降法：種々の処理を行った細胞に最終濃度 1% のフォルムアルデヒドを加え、SDS-lysis buffer で細胞を処理後、超音波処理によってクロマチンを破碎し、各種抗体を室温で 2 時間および 4°C で 1 時間反応させた。その後、protein G ビーズを加えて免疫沈降を行い、フォルムアルデヒドによる架橋反応を 65°C 6 時間の熱処理によって逆転させ、DNA を Qiagen spin column を用いて精製後、AP-4 結合領域を含む HIV LTR 部分の DNA (-176 to +61) を PCR で増幅し、AP-4 が結合している HIV-1 DNA を検出した。
- 6) in vitro DNA 結合反応：EMSA 法を用いた。HIV-1 LTR 上の配列 (-42 to +4) を含む合成オリゴ DNA を放射線標識したプローブを用いて細胞核抽出液と in vitro で反応したものをアクリルアミドゲル電気泳動し、DNA-蛋白複合体の移動度を観察した。
- 7) 遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイ：細胞への遺伝子導入は Fugene-6 を用いた市販のトランスフェクション試薬を使用した。ルシフェラーゼアッセイは、dual-luciferase assay kit を用いて行った。内部対照として pRL-TK 制御下にある Renilla luciferase 遺伝子と種々の HIV-1 LTR-Luc プラスミッドを同時に細胞内導入し、Renilla luciferase の値を基準に標準化した Luc 活性を比較した。
- 8) 細胞株とウイルス産生の定量：1) で述べた種々の HIV 感染培養細胞の上清への HIV 産生量の定量は、HIV-1 p24 antigen ELISA kit (Cellular Products 社) を用いた。また、siRNA 実験では、HIV 産生プラスミッド pNL4-3 と共に AP-4 をノックダウンするための合成 siRNA を Lipofectamine 2000 を用いて細胞内に導入した。

C. 結果

1. AP-4 による HIV の転写の負の制御 : AP-4 が HIV の転写に及ぼす影響を T 細胞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- α による HIV の転写活性を強く抑制した。LTR の AP-4 サイトを変異させた変異型 LTR においては抑制作用は認められなかった。実際に内在性の AP-4 が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 を細胞に導入した結果、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。

AP-4 は HLH-Zip 型の転写因子であり、N 末に DNA 結合に関わる HLH ドメインと dimerization に関わる leucine repeat (LR)、C 末には Q,P-rich と acidic ドメインが存在する。HIV 転写抑制における AP-4 の機能ドメインを調べるために、種々の変異型 AP-4 を作製しその効果を検討した。その結果、HLH ドメインを除いた変異型 AP-4 では抑制効果が認められなかったことから、HIV 転写の抑制には DNA との結合が必須であることがわかった。

2. AP-4 による HIV 転写抑制機構 : 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可能性が推察された。この点を AP-4 の組み換え蛋白を作製し EMSA にて検討した結果、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。

AP-4 による HIV 転写の抑制が TATA box のマスキングのみに依存しているか否かを調べるために、LTR 上の AP-4 の結合サイトを TATA box から離して AP-4 の効果を検討した。そのために、本来の AP-4 結合サイトを変異させた LTR

に、TATA box から様々の距離の所に新たに AP-4 サイトを挿入した変異型 LTR を作製し Luciferase assay を行った。その結果、野生型 LTR にはおとるものの、AP-4 サイトを TATA box から離れた位置に挿入した LTR においても AP-4 による阻害効果が認められた。以上の結果から、AP-4 は TBP のマスキング以外にも、何らかのメカニズムで HIV 転写を抑制していることが推察された。

転写の抑制機構において HDAC によるクロマチンレベルでの転写抑制が注目されている。そこで、AP-4 による HIV 転写抑制機構における HDAC の関与を検討した。AP-4 と HDAC が結合する可能性を免疫沈降法で調べた結果、AP-4 は内在性の HDAC1 および HDAC2 と結合することが認められた。実際に、AP-4 による抑制作用に HDAC が関与しているか否かを確認するために、HDAC の阻害剤である TSA を用いて検討した結果、TSA 処理により AP-4 による HIV の転写阻害作用は解除された。

3. HIV 潜伏感染細胞 LTR 上での AP-4 結合の動態 : 実際の HIV 感染細胞内での AP-4 と TBP、HDAC の動態を調べるために、HIV 慢性潜伏感染細胞である ACH2 と U1 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行い検討した。その結果、未刺激状態の細胞においては LTR への恒常的な AP-4 と HDAC1 の結合が認められ、TNF- α で細胞を刺激すると、LTR から AP-4 と HDAC1 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 を細胞に導入しクロマチン免疫沈降を行った結果、HDAC1 が LTR にリクルートされてこなかったことから、AP-4 が HDAC1 を LTR にリクルートしていることが推察された。

4. AP-4 の HIV 複製に対する抑制効果 : 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 pNL4-3 を導入し p24 ELISA assay を行った。その結果、AP-4 は basal レベ

ルでのウイルス複製とともに TNF- α による HIV の複製を抑制した。他方、AP-4 siRNA を pNL4-3 とともに細胞に導入すると HIV の複製は逆に上昇した。

D. 考察

以上の結果から、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 慢性潜伏感染細胞において、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- α 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結果を考え合わせると、感染細胞内での 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。

多施設臨床研究より感染者体内での HIV 量が AIDS の発症および薬剤耐性ウイルスの出現頻度と高く相関することが明らかになった。このことから、HIV 複製を抑制することで AIDS 発症が遅延し、HAART 療法の有効性が向上することが予測された。しかし、血中ウイルス量が検出限界以下になってもなお潜伏感染細胞が存在することが問題となっている。従って、AIDS 発症を食い止めるには潜伏感染細胞のプロウイルスからの転写レベルで活性化を阻止することが必須であると考えられる。一方で、潜伏感染細胞からのウイルス複製をよびおこし、HAART と組み合わせることによって潜伏感染細胞を排除しようとする臨床治験が実施されている。休止期にある HIV 感染 T 細胞に対し HDAC1 阻害剤 valproic acid や IL-7 を用いた結果、いずれの場合も潜伏感染細胞が有意に減少したことを報告している。しかしながら、HAART で用いる抗ウイルス剤の多くは脳などの組織への移行が充分でない（サンクチュリア）ことから、このような治療法ではたとえ末梢血中のウイルス量が減らすことができて、かえって脳内の HIV を増やす可能性があるため、長期間の治療効果を厳密に評価する必要がある。

AIDS 治療は HAART 療法により新たな段階を迎えるに至ったが、HIV は感染者の体内に潜伏

感染し続ける性質を持つため、現在の治療法が AIDS 発症防止に対しても長期間有効であるという保証はなく、また副作用や薬剤耐性ウイルスの出現など多くの課題が残されており、次世代の AIDS 治療薬・発症予防薬の開発が急務となっている。さらなる HIV の転写調節機構の解明は、新たな AIDS 治療法の開発につながることを期待できる。

E. 結論

転写因子 AP-4 は HIV の感染細胞内での潜伏感染の維持に必須の役割を演じている。この事実は今後 HIV 感染細胞を除去するための治療法を開発するための重要な視点を提供する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Victoriano, A. F. B, Asamitsu, K., Hibi, Y., Imai, K., Barzaga, N.G., and Okamoto, T.: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Replication in Latently Infected Cells by a Novel IKK Inhibitor. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 50: 547-555, 2006.
- 2) 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 κ B kinase inhibitor, *Leukemia* 20: 1-9, 2006.
- 3) Katagiri, D., Hayashi, H., Victoriano, A. 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
- 4) Okamoto, T., Sanda, T., and Asamitsu, K. NF- κ B signaling and carcinogenesis. <Review> *Curr. Pharm. Design*, 2006 (in press).
- 5) Imai, K. and Okamoto, T.: Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *J. Biol Chem.*, 281: 12495-12506, 2006.
- 6) Inoue, Y., Itoh, Y., Abe, K., Okamoto, T., Daitoku, H., Fukamizu, A., Onozaki, K., and Hayashi, H. Smad 3 is acetylated by p300/CBP to

- regulate its transcriptional activity. *Oncogene*, (advance online publication) 2006
- 7) Okamoto, T. NF- κ B and rheumatic diseases. <Review> *Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 6. 359-372. 2006
- 8) Kanazawa, S., Ota, S., Sekine, C., Tada, T., Otsuka, T., Okamoto, T., Sonderstrup, G, Peterlin, B.M.: Aberrant MHC class II expression in mouse joints leads to arthritis with extra-articular manifestations similar to rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 39. 14465-12505, 2006
- 9) Hamano T., Matsuo K., Hibi Y., Victoriano, A-F, B., Takahashi N., Mabuchi Y., Soji T., Irie S., Sawanpanyalert, P., Yanai H., Hara T., Yamazaki S., Yamamoto N., and Okamoto T.: A single nucleotide synonymous mutation in *gag* gene controlling human immunodeficiency virus type 1 virion production. *J. Virol.* 2007 (in press)..

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願中)

特許出願日 平成18年7月21日

ヒト関節リウマチの病態を再現するトランスジェニック非ヒト哺乳動物

(特願 2006-510787)

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

我々は、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）が細胞接触依存性に HIV-1 複製抑制効果を示すことを報告してきた。しかし、樹立した CTL 株のうち 1 株 (CTL-3) だけは細胞上清も HIV-1 抑制活性を示した。昨年度、我々はこの CTL 上清から HIV-1 抑制活性のある分画を部分精製し、質量分析の結果、Mycoplasma 由来の arginine deiminase (ADI) と同定した。本年度は、ADI がこの CTL 上清中の抗 HIV-1 活性の本体であるかどうかの確認および細胞毒性の解析を行なった。ADI は arginine を枯渇させる酵素であるので、培養中に過剰量の arginine を加えたところ、抗 HIV-1 効果は阻害された。また、同細胞株を抗 Mycoplasma 剤で処理すると、上清中の抗 HIV-1 活性は消失したが細胞接触依存性の抗 HIV-1 効果は残っていた。さらに、arginine を添加しても細胞接触依存性の HIV-1 抑制は影響を受けなかった。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。ADI を含む上清の添加により健常者由来のリンパ球には増殖抑制が認められたが細胞死は誘導しなかった。以上から、CD8 陽性 CTL の細胞接触による HIV-1 抑制は ADI と無関係であったが、CTL-3 株の上清の抗 HIV-1 活性の本体は ADI であったことが分かった。ADI はすでに抗癌剤として臨床試験の行なわれている薬剤であり、抗 HIV-1 薬としての開発可能性を持つと考えられる。

A. 研究目的

我々は、無症候 HIV-1 キャリアの CD8 陽性細胞だけでなく HIV-1 と無関係の抗原特異的 CD8 陽性 CTL 株が、細胞接触依存性に HIV-1 複製を抑制することを報告した。この HIV-1 抑制は細胞傷害活性とは異なり、上清は HIV-1 抑制活性を持たないため、液性

因子 CAF（CD8+ cell antiviral factor）とは異なる機序によると考えていた。ところが、樹立した CTL 株のうち 1 株 (CTL-3) だけは上清も HIV-1 抑制活性を示した。昨年度、我々はこの CTL 上清から HIV-1 抑制活性のある分画を部分精製し、質量分析の結果、Mycoplasma 由来の arginine

deiminase (ADI)と同定した。本年度は、ADIがこのCTL上清中の抗HIV-1活性の本体であるかどうかの確認および細胞毒性の解析を行なった。

2. 方法

1) アロ抗原特異的CD8陽性CTL株:

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+CTL株を樹立した。

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。

3) CTL-3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時間培養した上清をイオン交換および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。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。

4) 薬剤:

Mycoplasmaの除去には、抗Mycoplasma剤MC210を細胞株に添加し2週間培養した。過剰量(10 mM)のarginineあるいはコントロールと

して同量のglycineをHIV-1感染PBMCとCTLあるいはCTL上清との共培養中に添加し4日後のHIV-1 p24産生を測定した。

5) 細胞毒性の検定:

健常人由来PBMCをPHA刺激しIL-2存在下で1週間以上培養したものにADIを含む上清を加え、細胞増殖はチミジン取込みアッセイで、細胞死は7AADおよびAnnexinVで染色後FACSで検出した。

3. 結果

1) CTL-3培養上清のHIV-1抑制活性がADIによることの証明

Arginine deiminaseはarginineをcitrullineに加水分解しarginineの枯渇をもたらす酵素であり、外部からarginineを過剰量添加すると活性を中和することができる。そこで、CTL-3上清に過剰量のarginineを添加したところ、HIV-1抑制活性は消失した(図1)。また、同細胞株を抗Mycoplasma剤MC210で2週間処理しMycoplasmaを除去した後にハーベストした上清にはHIV-1抑制活性は認められなかった。

2) 細胞接触依存性のHIV-1抑制活性がADIと無関係であることの確認

Mycoplasmaを除去したCTL-3細胞株と、HIV-1感染させた自己PBMCとを共培養した場合にはHIV-1抑制活性効果が認められた。この培養に過剰量のarginineを添加してもHIV-1抑制活性は影響を受けなかった(図2)。

また、mycoplasma感染が無く、上清

には HIV-1 抑制活性を持たない他の CTL 株を用いた場合も、細胞接触依存性の HIV-1 抑制活性は arginine 添加の影響を受けなかった。

3) ADI の細胞毒性について

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。PHA 刺激した健常者由来のリンパ球に ADI を含む上清を添加すると、抗 HIV-1 効果の認められる濃度に一致して、増殖抑制が認められた。しかし、7AAD および AnnexinV 染色においては、細胞死誘導効果は認められなかった (図 3)。

4. 考察

CTL-3 細胞の上清から同定された ADI は同上清の HIV-1 抑制効果の本体であることが確認された。臨床的には mycoplasma は HIV-1 感染の増悪因子として報告されている。また、mycoplasma は DNase 活性を持つため reverse transcriptase assay で HIV-1 量を測定する際に見かけ上の HIV-1 抑制効果を示す事が報告されている。しかし、mycoplasma の ADI が HIV-1 抑制活性を持つことは、本研究で初めて見いだされた。

正常細胞は arginine を合成できるので、arginine 依存性の悪性腫瘍に対する抗癌剤として ADI の臨床試験が行なわれている。我々の解析では ADI は正常細胞に対して増殖抑制効果を示すが細胞毒性は顕著でなく、HIV-1 抑制は細胞死によるものではないと考えられる。

従来から我々が報告してきた CD8 陽

性 CTL の細胞接触依存性の HIV-1 抑制効果は、抗 mycoplasma 剤や arginine の過剰投与に影響されないことから、ADI とは無関係であることが分かった。散発的に mycoplasma 感染した CTL-3 のみが上清の HIV-1 抑制作用を示したことは、CD8 陽性 CTL の HIV-1 抑制効果が細胞接触依存性であることを再び確認する結果となった。CAF は標品が無いため ADI と比較できないが、未だに同定されておらず存在は疑わしい。

5. 結論

CTL-3 培養上清から同定された ADI は同上清 HIV-1 抑制効果の本体である。

CD8 陽性 CTL の HIV-1 抑制効果は細胞接触依存性であり、ADI 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 replication by arginine deiminase of *Mycoplasma arginini*. J Gen Virol, 87: 1589-1593, 2006

ii) Hamamoto, S., Nishitsuji, H., Amagasa, T., Kannagi, M., and Masuda, T. Identification of a novel human immunodeficiency virus type 1 integrase interactor, Gemin2, that facilitates efficient viral cDNA synthesis in vivo. J Virol, 80:

- 5670-5677, 2006.
- iii) Nishitsuji, H., Kohara, M., Kannagi, M., and Masuda, T. Effective suppression of human immunodeficiency virus type 1 through a combination of short- or long-hairpin RNAs targeting essential sequences for retroviral integration. *J Virol*, *80*: 7658-7666, 2006.
- iv) Komori, K., Hasegawa, A., Kurihara, K., Honda, T., Yokozeki, H., Masuda, T., and Kannagi, M. Reduction of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) proviral loads in rats orally infected with HTLV-1 by reimmunization with HTLV-1-infected cells. *J Virol*, *80*: 7375-7381, 2006.
- v) Kurihara, K., Shimizu, Y., Takamori, A., Harashima, N., Noji, M., Masuda, T., Utsunomiya, A., Okamura, J., and Kannagi, M. Human T-cell leukemia virus type-I (HTLV-I)-specific T-cell responses detected using three-divided glutathione-S-transferase (GST)-Tax fusion proteins. *J Immunol Methods*, *313*: 61-73, 2006.
- vi) Kanzawa, N., Nishigaki, K., Hayashi, T., Ishii, Y., Furukawa, S., Niino, A., Yasui, F., Kohara, M., Morita, K., Matsushima, K., Le, M. Q., Masuda, T., and Kannagi, M. Augmentation of chemokine production by severe acute respiratory syndrome coronavirus 3a/X1 and 7a/X4 proteins through NF-kappaB activation. *FEBS Lett*, *580*: 6807-6812, 2006.
1. 学会発表
- i) 林隆也、古川裕之、西辻裕紀、増田貴夫、神奈木真理. HIV-1 Nef による自然免疫系からのサイトカイン産生抑制に対するの影響. 第54回日本ウイルス学会、2006年、名古屋.
- ii) 西辻裕紀、小櫃冴美、林隆也、齋藤沙織、佐藤洋子、清水揚子、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 インテグラーゼと宿主因子 Gemin2 との相互作用機構とウイルス複製. 第54回日本ウイルス学会、2006年、名古屋.
- iii) 西辻裕紀、小櫃冴美、林隆也、齋藤沙織、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 複製における SMN 複合体と Gemin2 アイソタイプの役割. 第54回日本ウイルス学会、2006年、名古屋.
- iv) 林隆也、古川裕之、西辻裕紀、増田貴夫、神奈木真理. 自然免疫系のサイトカイン産生に対する HIV-1 Nef の影響. 第20回日本エイズ学会、2006年、東京.
- v) 西辻裕紀、小櫃冴美、林隆也、齋藤沙織、神奈木真理、増田貴夫. HIV-1 複製サイクルにおける HIV-1 integrase 宿主結合因子 Gemin2 の役割. 第20回日本エイズ学会、2006年、東京.
- vi) 高森絢子、栗原清、清水由紀子、原嶋奈々江、崔日承、鶴池直邦、田野崎隆二、宇都宮與、岡村純、神奈木真理. 成人 T 細胞白血病 (ATL) 患者における HTLV-I 特異的 T 細胞不応答. 第54回日本ウイルス学会学術集会、2006年11月、名古屋.

vii) 清水由紀子、栗原清、高森絢子、原嶋奈々江、宇都宮與、岡村純、西垣一男、増田貴夫、神奈木真理. 無症候 HTLV-I 感染者における HTLV-I 特異的 T 細胞応答. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月、名古屋.

viii) 神澤 範行、西垣 一男、林 隆也、新納 亜也子、石井雄一、安井文彦、小原 道法、森田 公一、松島 綱治、増田 貴夫、神奈木 真理. SARS-CoV 3a/X1 および 7a/X4 は NF- κ B を介して炎症性サイトカインの産生を増強する. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年 11 月、名古屋.

ix) Kazuo Nishigaki, Noriyuki Kanzawa, Takaya Hayashi, Fumihiko Yasui, Michinori Kohara, Koichi Morita, Kouji Matsushima, Takao Masuda, Mari Kannagi. Activation of NF- κ B by accessory gene products of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). 第 36 回日本免疫学会総会、2006 年 12 月、大阪.

G. 知的所有権の取得状況

無し

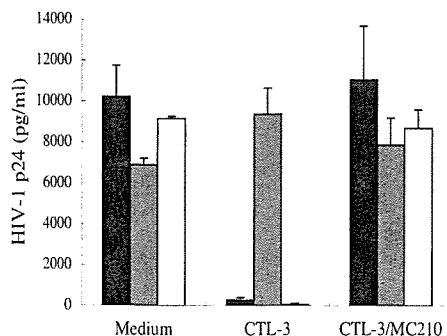


図 1. CTL-3 培養上清の HIV-1 抑制効果の過剰量 Arginine による中和.

HIV-1 感染 CD4 陽性 PBMC に Medium, CTL-3 上清, あるいは MC210 で mycoplasma 除去した CTL-3 上清を加え、さらに Medium (黒)、10 mM arginine (グレー) あるいは同量の glycine (白)を添加し、4 日培養後の HIV-1 p24 を測定した。

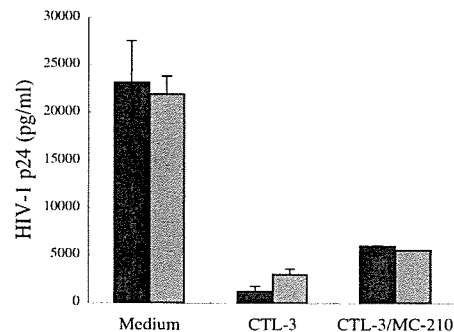


図 2. CTL-3 の細胞接触依存性の HIV-1 抑制効果は過剰量 Arginine に影響されない。

CTL と同一ドナー由来の CD4 陽性 PBMC に HIV-1 感染させ、Medium, CTL-3 細胞, あるいは MC 210 処理 CTL-3 細胞と混合し、さらに Medium (黒)あるいは 10 mM の arginine (グレー) を添加し、4 日培養後の HIV-1 p24 を測定した。

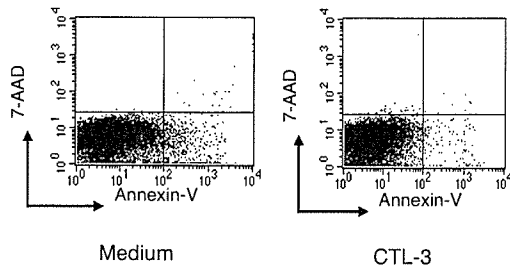


図3. ADIはCD4陽性PBMCに対し細胞死を誘導しない。

CD4陽性PBMCにmediumあるいはCTL-3培養上清を加え4日培養した後、7AADとAnnexinVで二重染色しFACSで解析した。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表(岩倉)

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
Hirota, K., Hashimoto, M., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Nomura, T., Yamaguchi, T., Iwakura, Y., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S.	T cell self-reactivity forms cytokine milieu for spontaneous development of IL-17 ⁺ helper T cells that cause autoimmune arthritis.	J. Exp. Med.			in press.
Sato, K., Suematsu, A., Okamoto, K., Yamaguchi, A., Morishita, Y., Kadono, Y., Tanaka, S., Kodama, T., Shizuo, A., Iwakura, Y., Cua, D. J., and Takayanagi, H.	T _H 17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction.	J. Exp. Med.			in press.
Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T., Nakamura, K., Kawakami, K., and Iwakura, Y.	Dectin-1 plays an important role in host defense against the pathogenic fungus <i>Pneumocystis carinii</i> .	Nature Immunol.	8	39-46	2007
Tsurutani, N., Yasuda, J., Yamamoto, N., Choi, B., Kadoki, M., and Iwakura, Y.	Nuclear import of the pre-integration complex is blocked upon infection by HIV-1 in mouse cells.	J. Virol.	81	677-688	2007
Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R., and Iwakura, Y.	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.	8	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 α 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	129-153	2006
Vonk, A. G., Netea, M. G., van Krieken, J. H., <u>Iwakura, Y.</u> , van der Meer, J. W. M., and Kullberg, J. B.	Endogenous interleukin-1 α and interleukin-1 β are crucial for host defense against disseminated candidiasis.	J. Infect. Dis.	193	1419-1426	2006
Chida, D., Osaka, T., Hashimoto, O., and <u>Iwakura, Y.</u>	Combined IL-6 and IL-1 deficiency causes obesity in young mice.	Diabetes	55	971-977	2006
Nambu, A., Nakae, S., and <u>Iwakura, Y.</u>	IL-1 β , but not IL-1 α , is required for antigen-specific T cell activation and the induction of local inflammation in the delayed-type hypersensitivity responses.	Int. Immunol.	18	701-712	2006
<u>Iwakura, Y.</u> , and Ishigame, H.	The IL-23/IL-17 axis in inflammation.	J. Clin. Invest.	116	1218-1222	2006
Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and <u>Iwakura, Y.</u>	IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis.	J. Immunol.	177	566-573	2006
Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., <u>Iwakura, Y.</u> , and Shibuya, M.	Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocyte/macrophage..	Blood	108	1849-1856	2006
Okada, K., Inoue, A., Okada, M., Murata, Y., Kakuta, S., Jigami, T., Shiraishi, H., Eguchi, K., Motomura, M., Akiyama, T., <u>Iwakura, Y.</u> , Higuchi, O., and Yamanashi, Y.	The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis.	Science	312	1802-1805	2006

Fujikado, N., Saijo, S., and Iwakura, Y.	Identification of arthritis-related gene clusters by microarray analysis of two independent mouse models for rheumatoid arthritis.	Arthritis Res. Ther.	8(R100)	1-13	2006
------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------	---------	------	------

研究成果の刊行に関する一覧表(志田)

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
Kitabatake, M, Inoue,S, Yasui, F, Shoji, Y, Arai,M, Morita, K, <u>Shida,H</u> , Kidokoro, M, Murai,F, Quynh, M, Le, Matsushima, K, and Kohara, M	SARS-CoV spike protein-expressing recombinant vaccinia virus efficiently induces neutralizing antibodies in rabbits pre-immunized with vaccinia virus.	Vaccine	25	630-637	2007
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	8	851-859	2006

研究成果の刊行に関する一覧表（小柳）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

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
Eda Y, Murakami T, Ami Y, Nakasone T, Takizawa M, Someya K, Kaizu M, Izumi Y, Yoshino N, Matsushita S, Higuchi H, Matsui H, Shinohara K, Takeuchi H, Koyanagi Y, Yamamoto N, Honda M.	Anti-V3 humanized antibody KD-247 effectively suppresses ex vivo generation of human immunodeficiency virus type 1 and affords sterile protection of monkeys against a heterologous simian/human immunodeficiency virus infection.	Journal of Virology	80	5563-5570	2006
Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya JI, Terunuma H, Kano S, Ishizaka Y.	Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers.	AIDS Research and Human Retroviruses	80	10683-10691	印刷中

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
Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, Yamamoto N.	Humanized mice for human retrovirus infection.	Current Topics of Microbiology and Immunology			印刷中
Miyazato P, Yasunaga J, Taniguchi Y, Koyanagi Y, Mitsuya H, Matsuoka M.	De novo HTLV-I Infection of Human Lymphocytes in Nonobese Diabetic-SCID, Common γ -Chain Knocked-Out Mice.	Journal of Virology	80	10683- 10691	2006

研究成果の刊行に関する一覧表(小糸)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

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
Watanabe N, Nishihara Y, Yamaguchi T, <u>Koito A</u> , Miyoshi H, Kakeya H, & Osada H	Fumagillin suppresses HIV-1 infection of macrophage through the inhibition of Vpr activity.	FEBS Letter	580	2598-2602	2006
Yoshimura K, Shibata J, Kimura T, Honda A, Maeda Y, <u>Koito A</u> , Murakami T, Mitsuya H, & Matsushita S.	Resistance profile of a neutralizing anti-HIV monoclonal antibody, KD-247, that shows favorable synergism with anti-CCR5 inhibitors in vitro.	AIDS	20	2065-2073	2006
Ikeda T, Shibata J, Yoshimura K, <u>Koito A</u> , & Matsushita S	Recurrent HIV-1 integration at the <i>BACH2</i> locus in resting CD4 ⁺ T cell populations during effective highly active antiretroviral therapy.	J. Infect. Des.	195	716-725	2007
Shibata J, Yoshimura K, Honda A, <u>Koito A</u> , Murakami T, & Matsushita S.	Impact of V2 mutations for escape from a potent neutralizing anti-V3 monoclonal antibody during in vitro selection of a primary HIV-1 isolate.	J. Virol. (in press)			2007

研究成果の刊行に関する一覧表(岡本)

書籍

著者名	題名	編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
岡本 尚	ELL	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	92-93
岡本 尚	DSIF	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	86-87
岡本 尚	NELF	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	145
岡本 尚	エロンゲーター	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	248
岡本 尚	S II	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	183
岡本 尚	エロンギン	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	246-247
岡本 尚	P-TEFb	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	167-168
岡本 尚	CSB	田村 隆明 山本 雅之	転写因子・転写制御キーワードブック	羊土社	東京	2006	75-76