

平成18年度 厚生労働科学研究研究費補助金
エイズ対策研究事業
課題番号 H16- エイズ- 一般- 003

HIV の増殖・変異の制御に関する研究

総括・分担研究報告書

平成19年3月

主任研究者 佐藤 裕徳
(国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・室長)

目 次

I. 総括研究報告書

1. 総括研究報告書 1
主任研究者：佐藤 裕徳 (国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター)

II. 分担研究報告

柱 1. HIV 複製制御研究

- (i) ウイルス侵入の制御 (感染受容体への吸着と細胞内侵入)
1. HIV-1 細胞侵入制御；脂質二重膜流動性制御因子の探求 5
分担研究者：原田 信志 (熊本大学大学院・医学薬学研究部感染防御分野)
2. HIV-1 感染における ERM ファミリー蛋白質の関与 9
分担研究者：久保 嘉直 (長崎大熱帯医学研究所・エイズ感染防御分野)
3. HIV 侵入・Nef の関与 (HIV-1 の細胞侵入過程の検討) 13
分担研究者：小島 朝人 (国立感染症研究所・感染病理部)
4. 南アフリカ薬草からの抗 HIV-1 活性成分の単離の試み 17
分担研究者：服部 俊夫 (東北大学大学院・医学系研究科感染病態学分野)
- (ii) 複製初期反応の制御 (脱殻、ゲノム逆転写、プロウイルス核内輸送と染色体組み込み)
5. HIV-1 マトリックス蛋白質 (MA) のウイルス感染前期過程における役割の検討と
変異体を用いて同定した MA 結合宿主因子の解析 21
分担研究者：村上 努 (国立感染症研究所・エイズ研究センター)
6. HIV-1 ゲノム動態に関与する宿主因子 25
分担研究者：増田 貴夫 (東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科免疫治療学)
7. HIV-1 プロウイルスの核移行：Vpr 核移行制御 29
分担研究者：間 陽子 (理化学研究所・分子ウイルス学研究ユニット)
- (iii) プロウイルス転写の制御
8. HIV-1 複製に関わる宿主因子の同定とその機能解析 33
分担研究者：生田 和良 (大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野)
9. 転写因子 AP-4 による細胞への HIV 潜伏感染の維持 37
分担研究者：岡本 尚 (名古屋市立大学院・医学研究科細胞分子生物学)
- (iv) 複製後期過程の制御 (Gag 細胞質輸送、集合、出芽)
10. HIV-1 粒子形成機構と宿主因子 43
分担研究者：森川 裕子 (北里大附生命科学研究所・ウイルス感染制御学教室)

I. 総括研究報告書

HIVの増殖・変異の制御に関する研究

課題番号：H16-エイズ一般-003

主任研究者：佐藤裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長）

分担研究者：村上努（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、駒野淳（国立感染症研究所エイズ研究センター 主任研究官）、西澤雅子（国立感染症研究所エイズ研究センター 研究官）、高橋秀宗（国立感染症研究所感染病理部 室長）、小島朝人（国立感染症研究所感染病理部 室長）、明里宏文（医薬基盤研究所 霊長類医学研究センター リーダー）、服部俊夫（東北大学院医学系研究科感染病態学分野 教授）、増田道明（獨協医科大微生物学 教授）、増田貴夫（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫治療学 助教授）、間陽子（理化学研分子ウイルス学研究ユニット エキスパートリーダー）、森川裕子（北里大生命科学研究所 教授）、岡本尚（名古屋市立大学院医学研究科細胞分子生物学 教授）、生田和良（大阪大微生物病研究所ウイルス免疫分野 教授）、櫻木淳一（大阪大微生物病研究所ウイルス感染制御分野 助手）、高折晃史（京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 助手）足立昭夫（徳島大大学院ヘルスバイオサイエンス研究部ウイルス病原学 教授）、久保嘉直（長崎大熱帯医学研究所エイズ感染防御分野 助手）、原田信志（熊本大大学院医学薬学研究部感染防御分野 教授）、三隅将吾（熊本大大学院医学薬学研究部薬学生化学 助教授）

研究要旨： HIV感染症の諸問題は、HIVが細胞に感染し、高速で変異しながら増殖することに端を発する。HIV感染症に科学的な方法で介入するには、ウイルスの増殖と変異のしくみを理解する必要がある。本研究では、依然として未解決の問題が多く残されているHIVの増殖と変異の分子機構について集中的に基礎研究を行なう枠組みをつくり、最新の科学知見を蓄積した。解析には、最新の実験科学と計算科学の手法を用いた。その結果、HIVの増殖と変異に関わる宿主因子を複数見出し、ウイルス増殖と変異の各ステップの分子レベルの理解が深まった。成果をもとに、HIV感染の動物モデル開発につながる重要な発見が得られた。また、新たな作用点をもつ抗HIV薬を開発するためのリード化合物を複数得た。

研究目的： 未解決の問題が多く残されているHIVの増殖と変異の分子機構を解析する。成果を新規抗HIV薬の開発等、エイズ対策研究に役立てる。

研究期間： 平成16-18年度

実施体制： 国立感染症研究所
大阪大学微生物病研究所
理化学研究所、医薬基盤研究所
北里生命科学研究所
長崎大学熱帯医学研究所
東北大学、東京医科歯科大学
名古屋市立大学、京都大学
徳島大学、熊本大学
獨協医科大学
計13施設20名

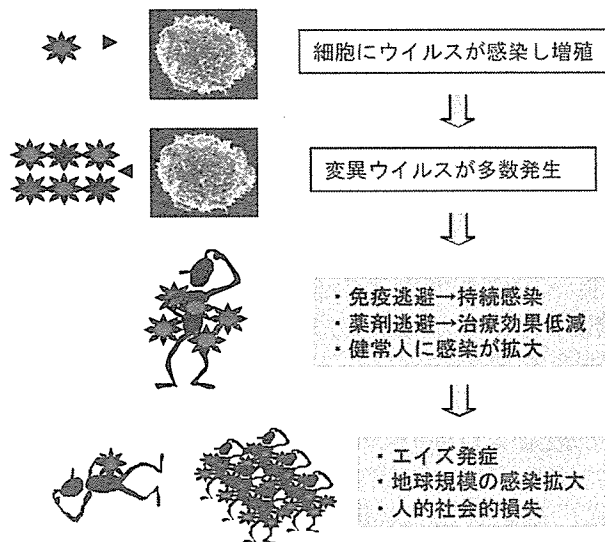
研究費： 16年度75,000、17年度70,000
18年度60,000（千円）

研究成果：

- (1) HIV感染の動物モデル開発につながる重要な発見をした。
- (2) HIVの増殖と変異に関わる宿主因子を複数見出した。
- (3) 新たな作用点をもつ抗HIV薬開発のためのリード化合物を複数得た。

研究概要

- ・ HIV感染症の諸問題は、HIVが細胞に感染し、高速で変異しながら増殖することに端を発する。
- ・ HIVの増殖と変異に関する基礎研究を集中的に行なう枠組みをつくり、最新の科学知見を蓄積した。
- ・ 解析には、実験科学と計算科学の手法を用いた。



1. 研究目的

世界の HIV 感染者数は約 4,000 万人に達し、我が国の新規感染者数も増加傾向にある。平成 9 年から普及した多剤併用療法 (HAART) により、HIV 感染者の致死率は劇的に低下した。しかし、現行の HAART は根治治療ではなく、恒常的に抗 HIV 薬を服用する。HIV の易変異性、服薬の不備等の理由で、薬剤耐性 HIV の発生を完全に阻止するのは困難な状況にある。危惧すべきことに、世界的に薬剤耐性 HIV の新規感染例は増加傾向にある。HIV の易変異性はまた、ウイルスの長期にわたる持続感染につながり、ワクチン開発をも難しいものにしていく。

耐性ウイルスの発生等、HIV 感染症の諸問題は、HIV が細胞に感染し、高速で変異しながら増殖することに端を発する。HIV 感染症に科学的な方法で介入するには、ウイルスの増殖と変異のしくみをよく理解する必要がある。本研究では、依然として未解決の問題が多く残されている HIV の増殖と変異の分子機構について集中的に基礎研究を行なう枠組みをつくり、最新の科学知見を蓄積し、成果を基に新たな抗 HIV 薬の開発等のエイズ対策研究基盤を強化することを目的とする。

2. 研究方法

解析には、主に分子遺伝学解析等の実験科学の手法を用いた。また、近年急速に進展している計算科学の手法を用いて蛋白質の立体構造解析を行なった。

柱 1. HIV 増殖研究：HIV の増殖調節因子を特定し、その働きを選択的に制御すれば特異性の高い抗 HIV 薬ができる。世界で競合する分野だが、国内で組織的に研究する体制が無い。そこで平成 16 年度にまず研究の枠組みをつくった。柱 1 では、HIV の複製過程を重要なステップに分け、それぞれを分担して解析した。複製過程を (i) ウイルスの感染受容体への吸着と細胞内侵入、(ii) 脱殻、ゲノム RNA 逆転写、プロウイルス核内輸送と染色体組み込み、(iii) プロウイルス転写、(iv) Gag 細胞質輸送、ゲノム二量体化、集合、出芽に分け、調節機構を解析した。

柱 2. HIV 変異研究：HIV 変異率を左右する因子を特定し、それらの働きに介入すれば、ウイルスの変化能や複製能が破綻し弱毒化すると推察される。HIV 変異については世界の基礎研究は少なく科学的に議論できる基盤は脆弱である。そこで、HIV 複製研究者の中から、特にウイルスの変異発生に関わるステップを解析する研究者を集め、ゲノム変異と組換えの機構を集中的に研究する枠組みをつくった。柱 2 では、(i) 逆転写酵素の基質選択調節機構、(ii) APOBEC3G の機能調節機構、(iii) ゲノム組み換え機構等を解析した。

立体構造解析：柱 1、2 で特定した複製・変異関与分子の立体構造がわかれば、特異性の高い抗 HIV 薬の開発につながる。そこで、幾つかの蛋白質をモデル分子として、計算科学の手法の精度検証を行なった。また、X 線結晶構造解析を行なった。

(倫理面への配慮)

ヒト由来材料 (血液) を使う場合は、所属機関倫理審査会の審議を受け、提供者の承諾とプライバシーの保護に万全を期した。動物実験は行っていない。

3. 研究結果

HIV の増殖と変異に関わる宿主因子を複数見出し、ウイルス増殖の各ステップの分子レベルでの理解が深まった。成果をもとに、HIV 感染の動物モデル開発につながる重要な発見が得られた。また、新規抗 HIV 薬開発のためのリード化合物を複数得た。分担研究の主な成果を以下に記す。

柱 1. HIV 増殖研究

- ① HIV の吸着・侵入：細胞膜と HIV エンベロープ蛋白質の流動性が HIV 感染性と関連すること (原田)、ERM ファミリー蛋白質が HIV の吸着・侵入に関与すること (久保)、Nef 欠損ウイルスは、細胞膜融合過程の進行が不完全で、エンドサイトシス等の経路に速やかに取り込まれること (小島) 等を見つけた。
- ② 脱殻・ゲノム逆転写：インテグラーゼの新機能を発見した。細胞内に侵入したウイルスゲノムとインテグラーゼは、細胞因子 Gemin2 と相互作用すること、こ

の相互作用は、HIV-1 のマクロファージ感染の際、ゲノム逆転写反応の進行に必要であることを示した (増田貴)。Gag マトリックス蛋白質と結合し、逆転写反応の進行に関与する可能性のある細胞因子 tRNA シンセターゼ複合体メンバーを見出した (村上)。

- ③ プロウイルス核内輸送：HIV-1 Vpr の新機能を見つけた。Vpr は核膜に結合した後に、Imp α を介して核移行し、この相互作用は HIV-1 のマクロファージでの増殖に必要であることを示した (間)。
- ④ プロウイルス転写：HIV-1 転写を阻害する細胞因子 RNF125 を同定した (生田)。IKK 阻害剤が NF- κ B を介する転写と HIV 増殖を抑制することを示し、新たな NF- κ B (p65 subunit) の相互作用因子として RNA helicase A (RHA) を同定した (岡本)。
- ⑤ 感染後期：HIV-1 Gag の新機能を見つけた。Gag の MA-CA 領域が、Syx6 の C 末側半分と相互作用すること、この相互作用は HIV 粒子形成に必須であることを示した (森川)。
- ⑥ HIV 調節蛋白質の働き：HIV-1 の種特異性を決定するウイルス因子が Vif とシクロフィリン A 結合ループであることを世界に先駆けて証明した。これらのウイルス分子を変えることにより、ゲノムの約 93% が HIV-1 由来でありながらサルで増殖するウイルスを作った。さらに、Vif の APOBEC3G 結合に関わる領域を決めた (足立)。HIV-1 Vpr は細胞の Wee1 機能昂進を介して G2 arrest を誘導すること、G2 arrest 誘導に 14-3-3 分子が関与すること等を見出した (増田道)。Vif の N 末端領域が Gag 成熟抑制効果をもつことを見出した (明里)。
- ⑦ ウイルス粒子のプロテオーム解析：p24 ホルミル化は、R5 および X4 virus 共通の翻訳後修飾であること、粒子内 HIV-1 p24 capsid は 6 つの isoform から構成されること、R5 ウイルス及び X4 ウイルス粒子内に宿主由来の cyclophilin A (CyPA) の 4 個のアイソフォームがあること、等を見出した (三隅)。
- ⑧ siRNA ライブラリーを用いて HIV-1 産生の昂進と抑制に働く細胞遺伝子 1 1 種

を同定した (生田)。

柱 1. HIV 変異研究

- ① HIV ゲノム変異：ATP が逆転写酵素の基質選択制御因子であること、薬剤耐性変異がウイルスの変異率を変動させることを見つけた (佐藤)。APOBEC3 による抗 HIV 作用の生化学・ウイルス学情報を蓄積した (高折)。Tat は OGG1 (酸化した DNA の修復に関わる酵素) の発現誘導を通じて、HIV および感染細胞のゲノムの安定性の維持に関与する可能性を示唆した (岡本)。新たな RNaseH 活性測定系をつくり、逆転写酵素の薬剤耐性変異が RNaseH 活性の変化をもたらすことを初めて示した (駒野)。
- ② HIV ゲノム組み換え：ゲノム二量体化シグナルを決めた。この領域の変異が逆転写反応の阻害に結びつくことを見つけた (櫻木)。トポイソメラーゼ I が組み換えを抑制し完全長 cDNA の合成を促進すること、組み換えの前段階である粒子成熟にも関わること等を見出した。また感染とフローサイトメトリーを用いて、短時間で種々の因子のウイルスゲノム組み換えに対する影響を測定する系を構築した (高橋)。

立体構造解析

- ① 結晶構造解析：HIV-1 CRF01_AE 株プロテアーゼの結晶構造解析に成功し、subtype B 株との相違を明らかにした。
- ② 計算科学解析：HIV 蛋白質構造機能の最新情報を組み合わせ、変異による蛋白質構造と機能の変化を予測するシステムをつくった。これを用いて、HIV-1 Gp41 変異による helix 構造変化を明らかにし、融合活性の変化を予測した。HIV-1 逆転写酵素変異による活性中心構造変化を明らかにし、酵素機能の変化を予測した。HIV-1 プロテアーゼ変異による活性中心構造変化を明らかにし、薬剤親和性の変化を予測した。共同研究でこれらの予測を実験で示した (佐藤)。Tat/TAR/Cyclin T1 分子複合体の立体構造を計算化学の各手法によって明らかにした (岡本)。

リード化合物の選別

(1) HIV の感染受容体への吸着と細胞内侵入の阻害：レチノイド類似体が HIV 感染を抑制すること (久保)、膜流動性調節因子グリチルリジンやファテビラシン等の糖脂

質が抗ウイルス作用を示すこと（原田）、南アフリカのヒーラーが HIV 感染者の治療に用いているアフリカの薬草、*C. molle*, *P. africanum* の抽出物に抗 HIV 活性があること（服部）を見出した。

（2）ゲノム RNA 逆転写の阻害：逆転写酵素の酵素学研究と *in silico* 解析により、新たな逆転写酵素阻害剤のリード化合物を選別した（佐藤）。ウイルス逆転写反応を阻害し、HIV 増殖抑制効果の優れた shRNA を設計した（増田貴）。

（3）プロウイルス核内輸送の阻害：Vpr 機能のハイスループット測定系をつくり、複製阻害のリード化合物を選別した（間）。

（4）Gag 集合の阻害：酵母 Cytotrap 法を適用して、Gag 間の相互作用を阻害するリード化合物を選別した（森川）。

4. 考察

（1）動物モデル開発への還元

HIV 感染動物モデルは、ウイルスの自然史の理解、予防治療薬とワクチンの評価等に必要である。足立らのレンチウイルスの種特異性機構に関する研究成果（サル細胞で増殖する HIV の作製）は、HIV 感染動物モデル開発のブレークスルーといえる。

（2）抗 HIV 薬開発への還元

久保、原田、小島らの成果は HIV の感染受容体への吸着と細胞内侵入の阻害剤開発、増田貴、間、村上らの成果は、ウイルス粒子の脱殻、ゲノム RNA 逆転写、プロウイルス核内輸送と染色体組み込み過程の阻害剤開発、岡本、生田らの成果は、プロウイルス転写制御の治療薬開発、森川、三隅らの成果は、Gag 細胞質輸送、集合、出芽の阻害剤開発、足立、間、増田道、明里らの成果は、HIV アクセサリー遺伝子産物の機能阻害剤開発、高折、駒野、高橋、櫻木、佐藤らの成果は、ウイルスの変異性に介入する方法の開発につながる。

間、森川、佐藤らの選別したリード化合物は、まだ阻害活性が弱い。改変の余地がある。

（3）感染症研究への還元

佐藤らの *in silico* 解析研究の成果（計算科学による病原性変化の予測と実験による検証）は、感染症研究に計算科学を適用

していくための基礎となる。

5. 自己評価

（1）達成度について：目標どおり、HIV の増殖と変異に関与する因子を多数特定し、生理的意義を明らかにした。新たな抗 HIV 薬開発のためのリード化合物も複数得た。我が国のウイルス学研究に計算科学と生物情報学を適用していくための礎をつくった。結晶構造解析に成功した。以上、各分担研究者は着実に成果を積み上げており、その達成度は高く評価できる。

（2）研究成果の学術的・国際的・社会的意義について：海外論文成果が示すように、研究の学術的水準、国際的な認知度は高い。当該研究成果は、新規抗 HIV の開発に重要な役割を果たす。また HIV 感染症の疫学・診断・予防・治療研究などに必要な基礎科学情報を提供する。したがって社会的な波及効果は高い。

3）今後の展望について：立体構造解析を進めて、得られたリード化合物の最適化を行なう。HIV の増殖と変異の分子機構について解析を続け、あらゆるエイズ対策研究の元となる基礎ウイルス学情報の蓄積を続ける。

6. 結論

当該研究の成果により、HIV 増殖と変異の各ステップの分子機構の理解が確実に進んだ。また、成果をもとに、作用点の異なる HIV 増殖阻害薬のリード化合物を選別することができた。さらに、HIV 感染動物モデルの開発につながるブレークスルー的発見につなげることができた。現在、我が国においても HIV 感染が拡大する兆候がある。HIV のライフサイクルに関する基礎研究を継続し、エイズ対策研究の科学基盤を強化することで、拡大する HIV 感染症の問題に備えることが増々重要となる。

知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

久保（レトロウイルス感染抑制剤：特願 2006-312040）、服部（HIV-1 分離株 SDA-1：AY902478）、生田（HIV 転写制御因子：特願 2005-083826）、岡本（NF- κ B 活性化抑制剤：特願 2004-3727、2004-3728、2005-2275

II. 分担研究報告書

HIV-1 細胞侵入制御；脂質二重膜流動性制御因子の探求

分担研究者 原田信志 熊本大学大学院医学薬学研究部感染防御 教授

研究要旨 膜流動性とウイルス感染価には密接な関連があり、これはエンベロープを有するウイルスにとって fusion pore の形成が細胞内への侵入に必須であることを示していると思われる。疎水性と親水性の性質を持つグリチルリチン(GL)は、脂質二重膜の流動性を修飾することにより HIV-1 等のエンベロープを有するウイルスに抗ウイルス作用を示した。同じ様に疎水性と親水性のドメインを持つ糖脂質に GL と同様の抗ウイルス作用があると考え、そのスクリーニングを行った。その中でファテビラシン FV-8 に強い抗 HIV-1 作用を認めた。ファテビラシン FV-8 は 40 μ g/ml の持続処理で 96% の HIV-1 感染を阻止した。しかし、GL 同様、400 μ g/ml ファテビラシンで細胞を前処理すると HIV-1 の感染は亢進した。ファテビラシン FV-8 には細胞融合抑制効果も認められた。これらの HIV-1 感染の亢進と抑制はファテビラシン FV-8 の膜流動性の増強と低下の作用のためであった。膜流動性を抑えることにより、エンベロープを有する広範囲なウイルスの感染を阻止することができる。GL より低濃度で抗ウイルス作用を示すファテビラシン FV-8 は、広領域抗ウイルス剤の一つの候補であると思われる。

A. 研究目的

HIV-1 エンベロープと細胞膜との fusion pore 形成がウイルス侵入に必要であり、この成立に細胞膜とウイルスエンベロープの流動性が関与している。このことから、膜流動性を抑制することによる感染阻止の方策を追求した。コレステロール様の構造を持つ水溶性の物質であるグリチルリチン(GL)は HIV-1 だけでなくインフルエンザ A ウイルスや VSV-G pseudovirus などの感染を 0.2~0.7mg/ml の持続処理で阻止し、膜の流動性も抑制した。また、HIV-1 や HTLV-I で誘導される細胞融合も持続処理で阻止した。しかし、1mg/ml GL で細胞をあらかじめ処理し、GL free の培地で感染実験や細胞融合実験を行うと、逆に感染価や細胞融合現象の亢進が見られた。同じ条件下で GL の細

胞膜流動性への作用を調べると、1mg/ml GL の持続処理では流動性の抑制、前処置では膜流動性が次第に亢進することが認められた。このように膜流動性とウイルス感染価には密接な関連があり、これはエンベロープを有するウイルスにとって fusion pore の形成が細胞内への侵入に必須であることを示していると思われた。

この GL の知見をもとにし、疎水性と親水性のドメインを有する分子には、脂質二重膜の流動性を修飾する性質があると考えた。この研究では、その候補として様々な糖脂質を用い、GL よりより抗ウイルス作用が強い物質の探究を行った。

B. 研究方法

1. 細胞とウイルス：GHOST/CXCR4 細胞、

MT-2 細胞、および HIV-1 の持続感染細胞である MOLT-4/C-2 細胞を使用した。ウイルスはルシフェラーゼ遺伝子を有し NL43 の env(X4)で pseudotyping した NL43-luc ウイルスを用いた。

2. 感染価の測定：GHOST/CXCR4 細胞と NL43-luc ウイルスを使用し、感染後 2 日目にルシフェラーゼ活性を測定した。

3. ウイルス吸着量の測定：細胞に吸着した HIV-1 の定量は p24 抗原を ELISA 法で測定することで行った。その他、Western blotting、混合培養による cell-cell fusion 測定などを行った。

4. 試薬：糖脂質として galactosylceramide, monosialoganglioside, capsianoside, fattiviracin を使用した。またコントロールとして脂質である sphingomyelin, sphingosine, lysophosphatidic acid を用いた。細胞膜流動性の測定：5-doxyyl stearic acid と細胞を室温で 20 分間反応させ、PBS で 3 回洗浄した。その後、細胞膜に取り込まれた 5-doxyyl stearic acid の動きを電子スピラベル(ESR)法で解析した。細胞膜の流動性は ESR の波形により order parameter (S) として算出した。

$$S = (A_{\parallel} - A_{\perp}) / 27.3 G$$

(倫理面での配慮はこの研究では必要ない)

C. 研究結果

1. 糖脂質の膜流動性調節因子としての抗 HIV-1 作用のスクリーニング：

まず流動性に影響し抗 HIV-1 作用をしめす因子のスクリーニングとして、低濃度 (40 μ g/ml) の持続処理で感染抑制し、高濃度 (400 μ g/ml) の前処理で感染亢進が認められる反応を応用した。糖脂質として galactosylceramide, monosialoganglioside, capsianoside, fattiviracin を使用した。またコントロールとして脂質である sphingomyelin, sphingosine, lysophosphatidic

sphingosine, lysophosphatidic acid を用いた。糖脂質では持続処理で感染抑制、前処理で HIV-1 感染亢進が認められたが、脂質ではそのような作用はみられなかった。分子量の大きい糖脂質であるファテビラシン FV-8 が最も強い抑制効果と促進効果を示した。ファテビラシン FV-8 の HIV-1 感染への作用：

ファテビラシン FV-8 の HIV-1 に対する作用は、6 μ g/ml で 50%の感染を抑制し、X4 も R5 HIV-1 も同様に作用した(図 1A)。HIV-1 粒子に直接作用させると、ウイルスの感染価が低下した。しかし、感染標的細胞を前処理すると効果はなく、400 μ g/ml ではむしろ 5 倍の感染増強が認められた (図 1C)。HIV-1 の吸着量にはファテビラシン FV-8 は影響を与えなかった (図 1D)。なお、ファテビラシンはヘルペスウイルス、VZV、インフルエンザ A ウイルスにも抗ウイルス作用を示すことが報告されている。

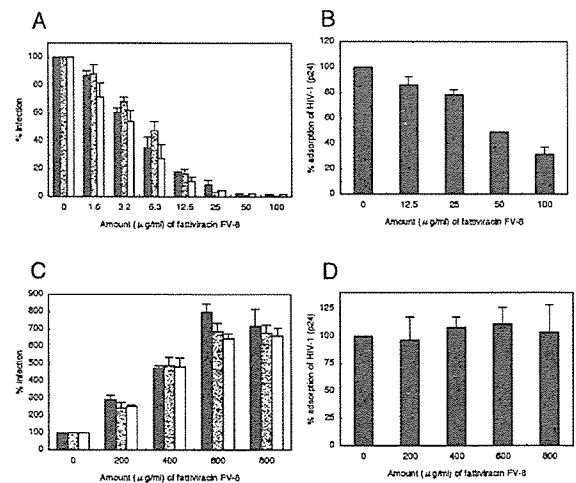


図 1 ファテビラシンの HIV-1 感染と吸着に与える影響

3. ファテビラシンの細胞融合への作用：

細胞の混合培養によるファテビラシン FV-8 の細胞融合抑制は、20 μ g/ml で HIV-1 (図 2B) と HTLV-I の両方で認められた。しかし、混合する細胞を 400 μ g/ml のファ

テピラシンであらかじめ処理すると、融合細胞のわずかな増加が見られた (図 2C)。

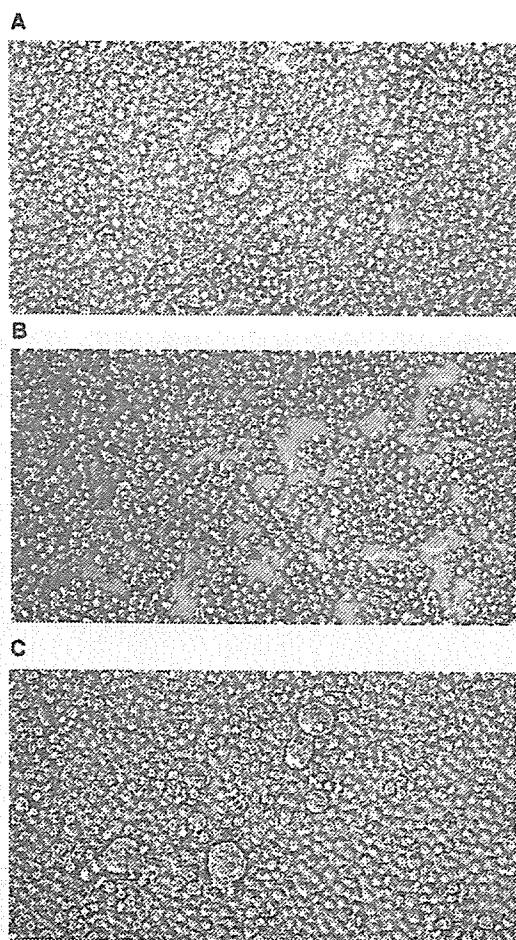


図 2 ファテピラシンの細胞融合への作用

4. ファテピラシン FV-8 の細胞膜流動性への経時的作用 :

膜の流動性は、MT-2 細胞を 25 μ g/ml のファテピラシン FV-8 で持続的に作用させると、有意に抑制された。しかし、200 μ g/ml ファテピラシン作用後、洗浄し、ESR を薬剤 free の培地で行うと膜流動性は急激に亢進した。この、流動性の変化は、HIV-1 の感染性と細胞融合の抑制と促進を良く説明するものであった。

D. 考察

ファテピラシン FV-8 は持続作用させると、

HIV-1 の感染を R5、X4 共に阻止した。また、インフルエンザ A ウイルスや VZV にも抑制的に作用することから、広範囲に抗ウイルス作用を示すものと思われた。このファテピラシンはウイルス粒子に直接作用し感染性を低下させ、混合培養による細胞融合現象も阻止した。しかし、高濃度で細胞を前処理すると、ウイルスの感染価も細胞融合効率も増強される。同じ条件下で、細胞膜の流動性を経時的に測定すると、持続的ファテピラシン処理では膜流動性は持続的に抑えられ、この糖脂質の前処理では細胞膜の流動性は急激に亢進した。この流動性の変化は、感染性と細胞融合能の変化と一致していた。

GL の抗ウイルス作用には 0.5 mg/ml と高い濃度が要求された。この事は GL の臨床応用には大きな問題である。しかし、ファテピラシン FV-8 は 6 μ g/ml で同様の 50% の抗ウイルス活性を示した。ファテピラシン FV-8 等の大きな糖脂質分子は脂質二重膜に濃度勾配に従って自由に入出入りし、その結果、膜の流動性を調節すると思われた。このような因子は、広範囲な抗ウイルス剤として今後開発が可能であると考えられた。

E. 結論

ファテピラシン FV-8 は 6 μ g/ml で持続的に作用させると、主にエンベロープを有するウイルスの感染を 50%阻止する。また、ウイルス粒子に直接作用しその感染性を低下させる。細胞の混合培養で見られる細胞融合現象も、ファテピラシンの持続作用で阻止される。しかし、細胞を 400 μ g/ml のファテピラシン FV-8 で前処理し、感染標的細胞として用いると HIV-1 の感染は亢進した。ファテピラシンの持続的作用では MT-2 細胞の膜流動性は持続的に抑制され、前処理ではその流動性は急激に亢進した。この処理法の差によるファテピラシン FV-8

の流動性修飾作用のスイッチ on - off は、感染価の増強・抑制と相関していた。従って、脂質二重膜の流動性は、恐らく fusion pore の形成と関連し、ウイルス感染の成立に重要である。また、ファテピラシンのような大きな糖脂質分子は、膜流動性を抑えることにより広範囲抗ウイルス剤として開発可能であると思われた。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Harada, S. Broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. *Biochem. J.* 392: 191-199, 2005.
- 2) Harada, S., Yokomizo, K., Monde, K., Maeda, Y., and Yusa, K. A broad antiviral neutral glycolipid, fattiviracin FV-8, is a membrane fluidity modulator. *Cell. Microbiol.* 9: 196-203, 2007.

2. 学会発表

- 1) Harada, S. Correlation of HIV-1 infection and membrane fluidity. 2005 Keystone Symposia HIV Pathogenesis / HIV Vaccines: Current Challenges and Future Prospects (X7/X8). April 9-15, 2005, Banff, Alberta,

Canada.

- 2) 原田信志、門出和精、前田洋助、遊佐敬介；膜流動性を抑制し抗ウイルス効果を示す糖脂質の検索、第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月、名古屋。
- 3) 門出和精、原田信志、前田洋助、遊佐敬介；HIV 侵入後におけるコレセプターのウイルスエンベロープ依存的な複製抑制効果の解析、第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月、名古屋。
- 4) 遊佐敬介、前田洋助、門出和精、原田信志；shRNA 発現 HIV-1 の複製能、第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月、名古屋。
- 5) 前田洋助、遊佐敬介、原田信志；ヒト T 細胞株における HIV-1 感染感受性の解析、第 54 回日本ウイルス学会総会、2006 年 11 月、名古屋。
- 6) 原田信志、門出和精、前田洋助、遊佐敬介；HIV を中和する抗体の作用機序の解析、第 20 回日本エイズ学会総会、2006 年 12 月、東京。
- 7) 前田洋助、遊佐敬介、原田信志；V3 領域の単独アミノ酸置換による R5X4 エンベロープのコレセプター選択性の解析、第 20 回日本エイズ学会総会、2006 年 12 月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし。

HIV-1 感染における ERM ファミリー蛋白質の関与

分担研究者： 久保 嘉直 (長崎大学 熱帯医学研究所 エイズ感染防御分野)

研究要旨：細胞骨格に依存した感染受容体の集合が、HIV-1 による感染や細胞融合に関与していることが報告されている。しかし、感染受容体と細胞骨格が直接的に結合している証拠はなく、それらを橋渡しするリンカー蛋白質の存在が示唆されている。そこで我々は、膜蛋白質と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質として機能することが既に知られている ERM ファミリー蛋白質であるエズリン、ラジキシン、モエシンの HIV-1 感染における作用を解析した。これらの遺伝子発現を RNAi によりノックダウンした細胞における HIV-1 ベクターの感染性を測定した。その結果、3 種類の遺伝子発現を同時にノックダウンした細胞において 20-50% に HIV-1 ベクターの感染力価が低下した。これらの結果は、ERM ファミリー蛋白質が HIV-1 感染に関与することを示している。

A. 研究目的

HIV-1 感染において、細胞骨格に依存した感染受容体の集合が重要であることが報告されている。しかし、感染受容体と細胞骨格が直接結合している証拠はない。これらの結果から、HIV-1 感染に重要な感染受容体と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質の存在が考えられる。しかし、そのようなリンカー蛋白質は、まだ報告されていない。

そこで我々は、膜蛋白質と細胞骨格を橋渡しするリンカー蛋白質として働くことが既に知られている ERM ファミリー蛋白質であるエズリン、ラジキシン、モエシンの HIV-1 感染における関与を解析した。エズリンのドミナント・ネガティブ変異体が、HIV-1 ベクター感染を抑制することを前年度の本班会議において報告した。引き続き、RNAi を用い ERM ファミリー蛋白質をノックダウンすることにより、これら蛋白質の HIV-1 感染における関与を解析した。

B. 研究方法

TE671/CD4/R5 細胞に RNAi をトランスフェクションした。トランスフェクションして 24 時間後に、LacZ 遺伝子を持つ CXCR4-tropic および CCR5-tropic HIV-1 ベクターを感染させた。感染 2 日後に X-Gal 染色することにより感染力価を測定した。コントロールとして VSV-G-pseudotyped HIV-1 ベクターを用いた。

RNAi により目的の蛋白質がノックダウンされたことを確認するため、エズリン、ラジキシン、モエシンを認識する抗体を用い ウエスタンブロッティングを行った。コントロールとして、抗アクチン抗体によるウエスタンブロッティングを行った。

感染受容体である CD4, CXCR4, CCR5 の細胞表面発現を FACS により解析した。

C. 研究結果

エズリン RNAi をトランスフェクションした細胞において、X4-tropic HIV-1 ベクターの感染性は約 40% に低下した。R5-tropic および VSV-G-pseudotyped HIV-1 ベクターの感染性には影響しなかった。VSV-G タグ抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、VSV-G タグ結合エズリンの発現は、RNAi により抑制されることが確認された。しかし、抗エズリン抗体を用い場合、発現抑制は観察されなかった。この抗エズリン抗体はラジキシンにも反応するためだと考えられる。

モエシン RNAi をトランスフェクションした細胞においても、X4-tropic HIV-1 ベクターの感染性は約 30% に低下したが、R5-tropic および VSV-G-pseudotyped HIV-1 ベクターの感染性には影響しなかった。抗モエシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、モエシンの発現が抑制さ

れることが確認された。

ラジキシン RNAi をトランスフェクションした細胞においては、X4-tropic および R5-tropic HIV-1 ベクターの感染性が約 50% に低下した。抗ラジキシン抗体を用いたウエスタンブロッティングにより、有意なラジキシン発現の低下は観察されなかった。エズリンの場合と同様に、本研究において使用した抗ラジキシン抗体はエズリンにも反応するためと考えられる。

3種類の RNAi を同時にトランスフェクションした細胞においては、X4-tropic HIV-1 ベクターの感染性は約 20% に、R5-tropic HIV-1 ベクターの感染性は約 50% に低下した (Fig. 1)。その他の HIV-1 strain の Env タンパク質を持つ HIV-1 ベクター感染も同様に抑制された (Fig. 2)。ERM 3 種類すべてのの蛋白質レベルの低下がウエスタンブロッティングにより観察された。本研究で用いた抗体は交差性を示すが、すべての発現が RNAi により抑制されたためと考えられる。

RNAi による HIV-1 の感染受容体発現に及ぼす影響を FACS により解析したが、影響は見られなかった。

D. 考察

これらの結果は、TE671 細胞における HIV-1 感染において ERM ファミリー蛋白質が関与していることを示している。特に X4-tropic HIV-1 ベクター感染には 3 種類の遺伝子とも関わっているが、R5-tropic HIV-1 ベクター感染にはラジキシンのみが関わっているようである。

我々の結果とは対照的に、最近モエシンが HIV-1 感染を抑制することが報告された。我々の研究においても、R5-tropic HIV-1 ベクターの感染性が、モエシン RNAi により増加する傾向が見られた。しかし、その効果は大きくなかった。研究に用いた細胞が異なっているために、対照的な結果が得られたのかもしれない。

E. 結論

ERM ファミリー蛋白質であるエズリン、ラジキシン、モエシンは、HIV-1 感染に関与することがわかった。X4-tropic HIV-1 ベク

ター感染においては 3 種類の遺伝子とも関わっているが、R5-tropic HIV-1 ベクター感染においてはラジキシンのみが関わっている。これらの分子が HIV-1 感染症の新しい治療標的となりえる可能性を示唆する。

F. 健康危険情報

該当事項なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- (1) 吉居廣朗、神山陽香、大石和徳、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹、久保嘉直：HeLa 細胞における CD4 非依存性 HIV-1 の細胞侵入抑制機構。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年、名古屋。
- (2) 久保嘉直、横山勝、吉居廣朗、神山陽香、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹：CXCR4 糖鎖付加による HIV-1 感染防御と、その回避機構。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年、名古屋。
- (3) 神山陽香、吉居廣朗、田中勇悦、佐藤裕徳、山本直樹、四童子好廣、久保嘉直：ビタミン A 類似体 Geranylgeranoic acid (GGA) による HIV-1 感染の抑制。第 54 回日本ウイルス学会学術集会、2006 年、名古屋。

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得(出願中)

レトロウイルス感染抑制剤

(特願 2006-312040)

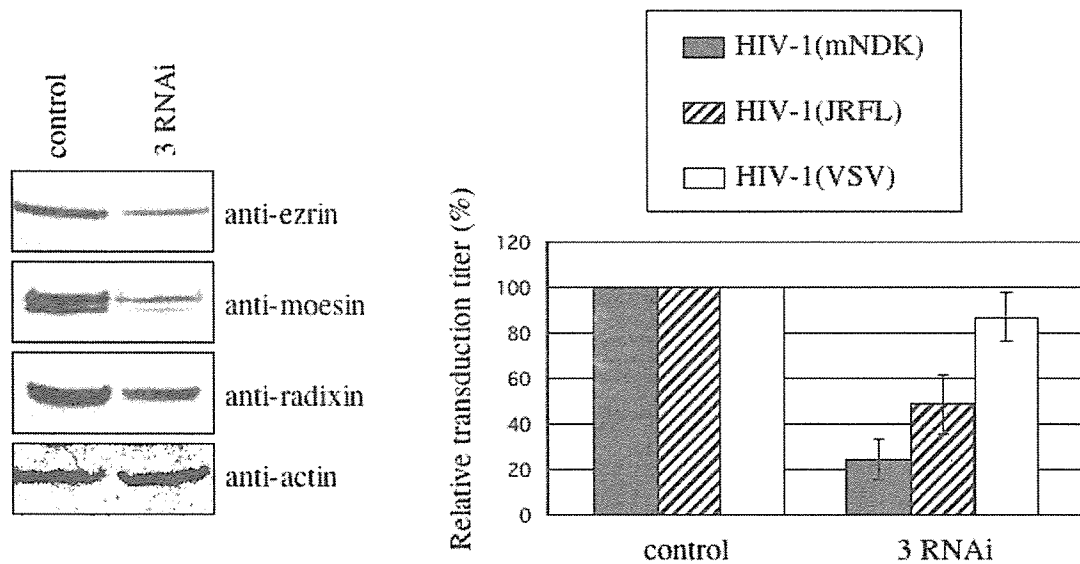


Fig. 1 Co-transfection of ezrin, radixin, and moesin RNAi inhibits HIV-1 vector transduction.

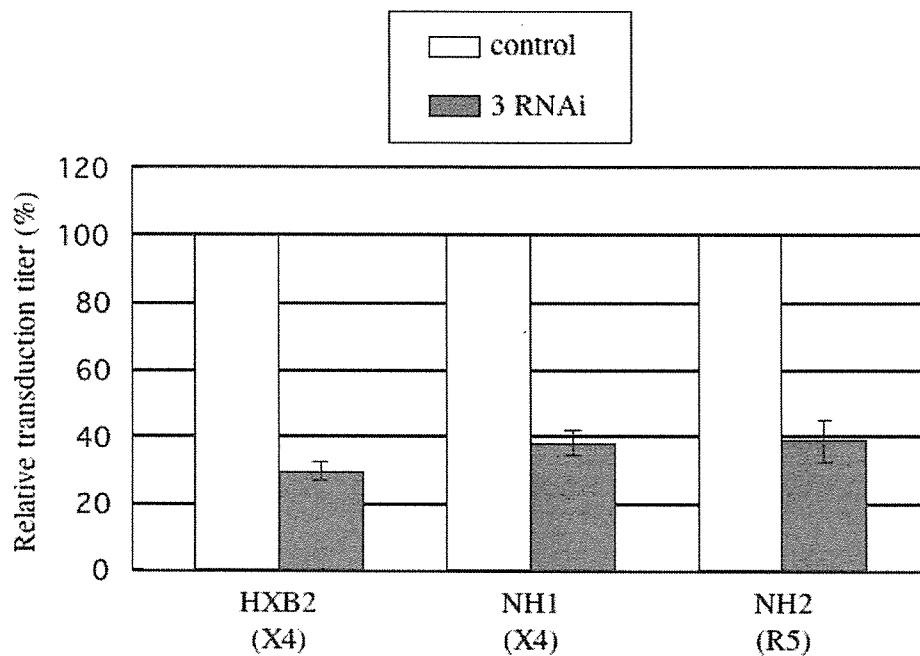


Fig. 2 Infection of other HIV-1 strains is inhibited by ERM RNAi.

研究課題：HIV侵入・Nefの関与（HIV-1の細胞侵入過程の検討）

分担研究者 小島 朝人 国立感染症研究所・感染病理部・室長

協力研究者 飛梅 実 国立感染症研究所・感染病理部・研究員

研究要旨：HIV-1の細胞への侵入は、生体側の膜蛋白CD4分子とウイルス側の膜蛋白gp120の結合を介して始まる。ウイルスの侵入経路を遮断することは薬剤耐性の発生危険の少ない最も有効な治療法となりえるが、詳細な侵入経路に対する知見は少ない。本研究ではこれまで、侵入素過程を詳細に調べるため、*in vitro*無細胞解析系樹立及びFRETの技術を用いたvirus-cell fusion assay樹立を試み、良好な成績を得てきた。これらの系を用いた解析によりHIV-1のアクセサリー遺伝子産物Nefがウイルスの標的細胞への侵入過程に影響を与え、結果としてウイルスの感染性を増強させていることが示唆された。そこで本年度は、HIV(Nef+/-)のウイルス粒子、またNef存在、非存在下で作製したVSV-G, SFV-Envを持つシュードタイプHIV-1粒子を用いて、NefがHIV-1粒子の標的細胞に感染する際のどのステップに影響を与えるかについて検討した。その結果、吸着・侵入過程にはNef+/-の差が認められなかった。これらの事から、吸着以降・逆転写前、即ち、細胞内侵入過程に何らかの拘束因子の介在が示唆された。

A.研究目的

HIV粒子の標的細胞への侵入はEnvと細胞膜リセプターとの結合から始まり、膜融合・脱殻を経て最終的に感染が成立する。この初期の侵入過程の解明は、新たなAIDS治療薬創生のための標的を提示する鍵を与えるものと考えられるが、現在得られている知見は乏しい。この点に関し飛梅らは、侵入過程に関与するウイルス因子としてNefの存在を示唆してきた。そこで本研究では、HIV-1のアクセサリー遺伝子産物Nefに焦点を当て、ウイルス粒子の標的細胞への侵入機序を明らかにすることを目標とする。

B.研究方法

感染性シュードタイプウイルス粒子を作製するために感染性HIV-1 DNAクローンR8 Δ E(R8Env欠損株)、R8 Δ E Δ N(R8Env及びNef欠損株)を用いた。またMuLV-GP (Moloney Murine Leukemia Virus Gag, Pol) をMuLVをコアに持つシュードタイプウイルス作製に用いた。ウイルスの産生細胞には293T細胞を用い、リン酸カルシウム法を用いて目的に応じたタイプのウイルスエンベロープ発現プラスミドとコトランスフェクションし、48時間後の培養上清をウイルス液として用いた。感染価の評価には、標的細胞としてMAGIC5細胞及びMT4細胞を用い、ウイルス添加48時間後に感染価を評価した。HIV-1の標的細胞への吸着を阻害する目

的でsCD4を用いた。また、エンドサイトーシスの経路を阻害する目的で、エンドソーム内のpH低下を抑制するNH₄Cl及びBafilomycine A1を用いた。

(倫理面への配慮) 該当事項無し。

C. 研究結果

1) Nef存在下で放出されたウイルスの感染性は、Nef非存在下で放出されたウイルスの感染価に比べ10倍程度強かった。

2) ウイルス粒子を標的細胞に添加後、時間経過ごとにsCD4を加えた場合の感染性にはNef存在・非存在下で作製したウイルス間に差異はなかった。

3) MuLVをコアに持つウイルス粒子には、HIV-1 Env全長を発現させることは不可能であった。細胞内領域を欠損させることで、HIV-1 Env発現MuLV粒子作製が可能になった。このとき、MuLV-Envシュードタイプウイルスの感染性にNefは影響を与えなかった。

4) NH₄Cl存在下で、ウイルス粒子を標的細胞に加えた場合、Nef存在・非存在下で作成したウイルス共に感染性が増強した。感染性の増強はNef非存在下で作成したウイルスで顕著に認められた。

D. 考察

HIV-1 EnvやMuLV-Envを持つシュードタイプHIV粒子の感染性はウイルス粒子作成時にNefが存在しない場合非常に低い。しかしながら、MuLVをコアに持つウイルスではNefによる感染性増強作用は認められない。また、MuLV粒子にはHIV-1 Env全長を発現させることは不可能で、細

胞内領域を欠損させることで可能になった。このウイルスではNefによる感染性増強効果は認められない。また、HIV-1構成蛋白質のうち、Gag及びPolがNefによる感染性増強作用を受ける最小単位であった。これらのことは、HIV-1粒子特異的にNefが作用していることを示唆すると同時に、HIV粒子は非常に厳密に規定された部位から出芽する可能性が示唆された。

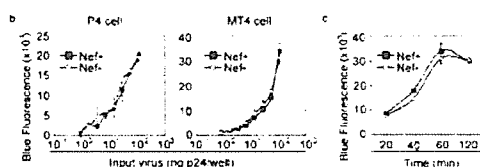
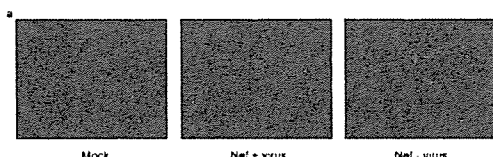
これまでの研究では、エンドサイトーシスの経路を利用し細胞内に進入し、エンドソーム内の酸性条件で膜融合が誘導されるVSV-Gシュードタイプウイルスの感染性にはNefの存在、非存在による差異は2倍程度であったが、VSV-Gと同様にエンドソーム内の酸性条件下で膜融合が誘導されるSFV、RRVのEnvを用いたシュードタイプウイルスの感染性はNef存在下で作成した場合、非存在下で作成したウイルスよりも優位に高く、Nefによるウイルス感染性増強作用は細胞膜上かエンドソーム内膜かという膜融合部位に規定されることが示唆されている。また、NH₄ClまたはBafilomycine A1存在下で培養液を酸性条件に置換しVSV-Gシュードタイプウイルスの膜融合を強制的に細胞膜上で誘導した場合、Nef-ウイルスの感染価は薬剤無添加群の感染価と同程度を保持していたが、Nef+ウイルスの感染価は薬剤無添加群に比べ50%以上低下していた。これは、強制的に細胞膜上で膜融合を誘導することで、Nefによるウイルスの感染性増強作用機序を回避していると考えられる。

一方、HIV-1は標的細胞の細胞膜上で膜融合を起こし、細胞内に進入する。この場合、

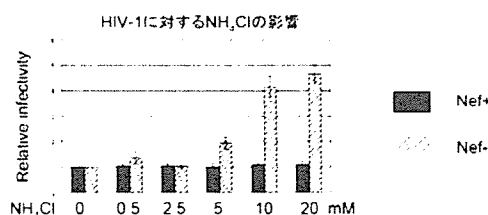
エンドサイトーシス等の侵入経路は介さない。しかしながら、HIV-1添加時に標的細胞をNH₄Clで処理した場合、ウイルスの感染性が増強することが確認された。NH₄Cl添加による感染性増強効果はNef欠損ウイルスでは無添加群の5倍程度に達した。このことより、Nef欠損ウイルスは潜在的な感染性を有していることが明らかとなった。また、NH₄Clはエンドサイトーシス経路を遮断することが分かっており、Nef欠損ウイルスはエンドサイトーシスの経路を通り細胞内に進入していることが示唆された。

E. 結論

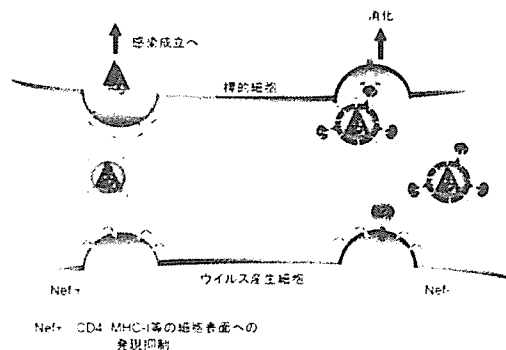
これまでの研究により、HIV-1の細胞内への進入量はNefの有無に関わらず同程度であること、またエンドサイトーシスの経路を介した消化系を遮断することで、Nef欠損ウイルスの感染性が回復することが明らかとなった（下図参照）。



ウイルス粒子内に保持されたβラクタマーゼ(Vpr-BlaM)を用いた、FRET切断系による標的細胞内への侵入ウイルス量評価



これらのことは、ウイルス産生細胞中でNefにより修飾を受けたウイルス粒子は、標的細胞に吸着後、消化系に輸送される経路に取り込まれることを回避する機序が存在することを示唆する。以下に本研究から得られたNefによるウイルス感染性増強作用について、推察される機序を示す。



F.健康危険情報：該当事項無し。

G. 研究発表

.論文発表

1: Simian fetal brain progenitor cells for studying viral neuropathogenesis *Journal of Neurovirology* in press, Naoko Iwata, Hiroaki Yoshida, Minoru Tobiume, Fumiko Ono, Takuya Shimazaki, Tetsutaro Sata and Noriko Nakajima,

2: Tristetraprolin inhibits HIV-1 production by binding to genomic RNA. *Microbes and Infection* 8, 2647-2656, 2006 Maeda, M. Sawa, H. Tobiume, M. Tokunaga, K. Hasegawa, H. Ichinohe, T. Sata, T. Moriyama, M. Hall,

W.W. Kurata, K. and Takahashi, H.

H.知的財産権の出願・登録状況
該当事項無し。