

## 南アフリカ薬草からの抗 HIV-1 活性成分の単離の試み

分担研究者：服部俊夫 東北大学大学院医学系研究科感染症・呼吸器病態学分野 教授

研究協力者 鈴木康弘、Andros Theo、

大島吉輝 東北大学大学院薬学研究科 医薬資源化学分野教授

### 研究要旨

我々は HIV-1 を対象とした代替医療に抗 HIV-1 活性を示す薬物が隠されていないか研究  
中である。このために南アフリカでヒーラーが治療に用いているアフリカ原生植物を 4 種類採取し、そ  
の抽出エキス中に抗 HIV-1 活性があるかどうかを検討した。植物の二つは HIV-1 治療に用いら  
れているもので、残りは結核治療に用いられているものであるが、HIV-1 治療に用いられて  
いる植物 *Combretum molle* と *Peltophorum africanum* の抽出エキス中に抗 HIV-1 活性があること  
を MAGI 細胞を用いた系で明らかにした。現在、活性物質を東北大学薬学部大島研究室と  
共同で分離中であるが今回はその途中経過を報告する。

### 1. 南アフリカ薬草からの抗 HIV-1 活性成分の単 離の試み

#### A. 研究目的/手段

サハラ砂漠以南のアフリカではヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染者数が成人人口の 20-40% に達し、  
国家や社会が事実上の崩壊の事態に直面し  
ている国も少なくない。わが国でも、HIV-1  
感染者数が 1 万人を超えた事が報告された  
が、実際はその 4 倍の自己の感染に気づいて  
いない感染者が存在すると推測されている。  
この様な世界規模での驚異的な HIV-1 感染  
者数増加を前により効果的で且つ安価な治  
療法の開発が不可欠であるという切実な現

状が浮かび上がってくる。

我々は HIV-1 を対象とした代替医療に抗  
HIV-1 治療のヒントが隠されていないかと考え  
て研究を開始した。南アフリカ共和国のヒーラー  
により HIV-1 治療に用いているアフリカ原生植物  
を 4 種類採取し、その抽出エキス中に抗 HIV-1  
活性があるかどうかを検討した。

#### B. 材料・方法

**ウイルス作成：** pNL43-2 plasmid を 293T 細胞  
に導入し、48 時間後の培養液を回収する事  
でウイルスの作成を行った。

**細胞株・感染の測定：** 実験には、MAGI 細

胞を用いた。これはウイルスが細胞内に侵入し、HIV-1 Tatが作られるとlacZ産物が作られる。lacZ産生はCPRGで発色させて、wavelength 570nm光度計で測定する。

### アフリカ原生植物の抽出物

*Combretum molle*, *Peltophorum africanum* (図1), *Carissa edulis*, 及び *Lipio javanica* よりメタノール抽出物を抽出し抗HIV-1活性をMAGI細胞を用いた系で明らかにした。さらに活性が明らかになった植物については、酢酸エチル可溶画分、水可溶画分、n-ブタノール可溶画分に分画し、それぞれの活性を測定すると主に酢酸エチル可溶画分およびn-ブタノール可溶画分はシリカゲルカラムクロマトグラフィを用いて5つの画分に分画し、どの画分に活性成分が濃縮されるかを明らかにして、最終的に活性成分の単離にのぞむ予定である (図2)。

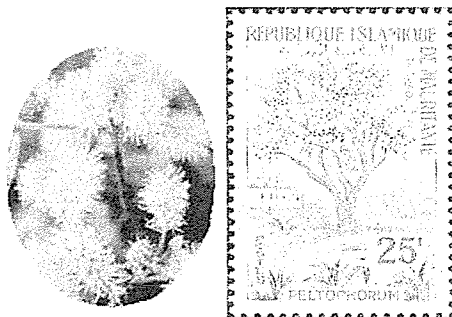


図1: *Combretum molle* (左) と *Peltophorum africanum* (右)  
*Combretum molle*: シンクン科ヨツバネカズラ属  
 この仲間は、世界の熱帯域に広く分布する。もともと、民間薬として、様々な病気に使われていた。  
*Peltophorum africanum*: マメ科トゲシシヤツ属  
 熱帯アフリカ、南アフリカ、ナミビアに自生する半落葉性の樹木。家畜の飼料、家具材、燃料などに利用される。また蜜源植物でもある。根は傷、歯、咳止め、妊婦の痛み止めなどの治療に用いられる。かつては樹皮、葉、根が寄生虫の駆除などにも利用された。

### C. 研究結果

*Combretum molle* はシンクン科ヨツバネカズラ属に属する植物であるが、もともと、民間薬として、様々な病気に使われており、現地では、チンパンジーが、そのヤニを好んで食べることが観察され

ている。また、*Peltophorum africanum* マメ科トゲシシヤツ属に属する植物であるが、これは熱帯アフリカ、南アフリカ、ナミビアに自生する半落葉性の樹木で、その根は傷、歯、咳止め、妊婦の痛み止めなどの治療に用いられるものであるが、この2種類の植物は現地ヒーラーにより HIV-1 治療に用いられているものであるが、この二つの薬物のみに HIV の複製を阻止する活性がある事を確認した(図 2)。この有効成分がどのような物質なのか、方法に示したように東北大学薬学部大島教授と共同研究で同定している最中である、現在、四角で囲った画分に活性があることが同定されている。今後さらに画分を繰り返し、活性成分を同定する予定である。

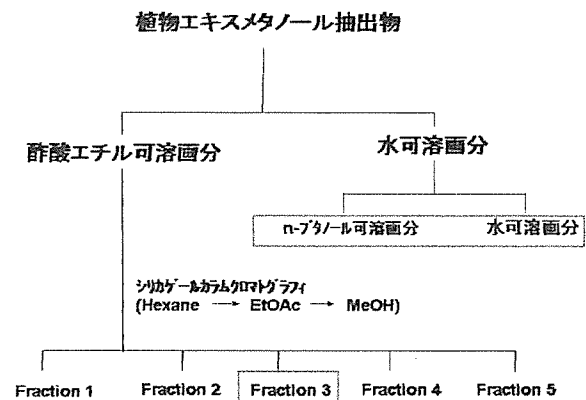


図2 抗 HIV 成分の精製と同定概要  
 酢酸エチル可溶画分、水可溶画分、n-ブタノール可溶画分、に分画しそれぞれの活性を測定すると主に酢酸エチル可溶画分およびn-ブタノール可溶画分はシリカゲルカラムクロマトグラフィを用いて5つの画分に分画する。たとえば *C. molle* については枠の画分に抗 HIV 活性がみられた。

### D. 考察

#### 本年度の成果

#### 自己評価

以上のことより、HIV-1 代替療法に用いられている植物中に確かに抗 HIV-1 活性があることが明らかになった。今後、この活性成分を同定すると共に抗 HIV-1 活性のメカニズムを明らかに

する予定である。このような、抗 HIV-1 活性物質は、抗 HIV-1 治療薬の lead compound として有効であると考えられる。

SARS-CoV entry in vitro. 第54回日本ウイルス学会学術集会, 11月19日-21日, 2006, 名古屋国際会議場 イベントホール

#### F. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

SDA-1 は AY902478 に登録した。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. Li, D., Gu, H. X., Zhang, S. Y., Zhong, Z. H., Zhuang, M. and Hattori, T. YMDD mutations and genotypes of HBV in Northern China. *Japanese J. Infect. Dis.* **59**:42-45, 2006.
2. Usami, O., Xiao, P., Hong Ling, H. and Hattori, T. Competitive Study of Monoclonal Antibodies Against the HIV-1 Gp41 Core Structure. *Microbiol. Immunol.* **50**: 131-134, 2006.
3. 服部俊夫, 芦野有悟, 宇佐美修, 古田里佳. HIV の感染と増殖のメカニズム. *診断と治療.* 94(12), 2006.

##### 学会発表

1. Xiao, P., Ling, H., Usami, O., Furuta, R. A., Shimizu, N., Hoshino, H., Zhuang, M., Hattori, T. Characterization of a CD4-independent primary HIV-1 isolate from Pneumocystis Pneumonia patient. 10th Anniversary Annual International Meeting of the Institute of Human Virology, November 17-19, 2006, Hyatt Regency Baltimore, Baltimore, Maryland, U.S.A.
2. 庄敏, 蔣虹, 古田理佳, 肖鵬, 服部俊夫. The inhibitory effect of medical herbs on

## 厚生科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）分担研究報告書

### HIV-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

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

研究要旨: 昨年度 Tagged-MS 法を用いて MA 強制発現細胞破碎液から MA と相互作用する宿主因子としてアミノアシル tRNA シンセターゼ (aaRS) 複合体構成メンバーを同定した。今回、aaRS と MA との相互作用の強さは、野生型>復帰変異体 (L20K/E73K/A82T) >変異体 (L20K) の順になり、ウイルス増殖能を反映していることを明らかにした。また、MA と aaRS との相互作用は、RNA を介して主に細胞質で起こっていることが示唆された。MA と aaRS との相互作用のウイルス学的意義については現在検討中である。もう一つの課題である MA のウイルス感染前期過程における役割の解析については、ウイルス侵入後の脱殻過程を擬似していると考えられるコアの調製を行い、MA 変異体 C86S において MA のコアへの強い親和性とこの変異によって生じる欠損とが関連しているという結果を得た。また、VLP を種々の濃度の界面活性剤で処理することにより Env-Gag の相互作用を調べる実験から L49D 変異によるウイルス侵入後欠損が gp41 の細胞内ドメインと L49D の MA との強い相互作用による可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

HIV-1 マトリックス蛋白質 (MA) 結合宿主因子の研究では昨年度 Tagged-MS 法を用いて MA 強制発現細胞破碎液から MA と相互作用する宿主因子としてアミノアシル tRNA シンセターゼ (aaRS) 複合体構成メンバーを同定した。今年度はその相互作用について、相互作用の強さとウイルス増殖能の関係、相互作用の細胞内の場所、相互作用の RNA 依存性などについて検討を行った

昨年度までに、ウイルス感染前期過程 (特に侵入直後の脱殻、逆転写) における役割についての役割がよくわかっていない MA について、感染後期過程への影響が少ないと考えられる3つの MA 変異体 (V6R、L49D、C86S) を選び HIV-1 感染前期過程に対する影響を種々の方法を用いて検討した。その結果、MA 変異

体 L49D と C86S は膜融合から脱殻に至る過程に、V6R は逆転写そのものもしくはそれ以降の過程に欠損を有していることを示唆された。今年度は、それらの欠損メカニズムを明らかにするために、ウイルス侵入後の脱殻過程を擬似していると考えられるコアの調製を行い野生型、変異体、復帰変異体で比較した。また、L49D については、VLP を用いた Env-Gag (MA) 相互作用測定系によってその相互作用の強さを野生型、復帰変異体のそれと比較した。

#### B. 研究方法

(1) MA と相互作用する aaRS の解析: C 末端に FLAG タグを付加させた MA 発現プラスミド (pCMMPP17MA) を 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞ライセートを調製し抗 FLAG 抗体、または抗 Isoleucyl tRNA Synthetase 抗体で免疫沈降

した。免疫沈降物を SDS-PAGE にて分離し、PVDF 膜に転写後、5% スキムミルク/PBST (3% BSA/PBST) にて室温で1時間ブロッキングした。抗体、酵素複合体は 1% スキムミルク/PBST (1% BSA/PBST) で至適濃度に希釈した。一次抗体は 1 時間、ビオチン標識二次抗体、次いで、HRP 標識ストレプトアビジンを 30 分間室温で反応させた。基質液として ECL Advance Western Blotting Detection kit(GE Healthcare)、Lumilight PLUS Western Blotting (Roche) を使用した。

(2) 細胞分画：MA 発現 293T 細胞を ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) を用いプロトコールに従い、細胞質、膜/オルガネラ、核、細胞骨格画分に分画した。

(3) RNase 処理：MA 宿主タンパク質複合体に RNase A を 0.05、0.1、0.2 mg/ml の濃度になるように加え、37°C で 1 時間処理をした。

(4) ウイルス粒子中からの RNA 抽出：HIV-1 分子クローン (野生型：pNL4-3) を 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の培養上清中ウイルス粒子を超遠心分離により回収した。回収したウイルス粒子をフェノール/クロロホルム処理し、核酸を抽出した。抽出した核酸に最終濃度 0.5 unit/ $\mu$ l になるように DNase I を加え 37°C にて 30 分間処理を行い RNA のみを回収した。

(5) tRNA<sup>Lys3</sup> の検出：抽出した RNA を Ny+ 膜にプロットし、3' 末端を fluorescein でラベルした tRNA<sup>Lys3</sup> probe を、プロットした RNA にハイブリダイズさせた。アルカリホスファターゼ標識抗 fluorescein 抗体を 0.5% BSA 存在下で反応させ、基質液として CDP-Star (GE Healthcare) を用いた。

(6) VLP、成熟ウイルス粒子のコアの調製：Gag、Env 発現プラスミドもしくは HIV-1 分子クローンを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の培養上清中の VLP またはウイルス粒子を超遠心分離により回収した。回収物を種々の濃度の界面活性剤で処理した後、30%、20% スクロースの重層液の上部に添加し、再度超遠心を行い分画後、

比重測定、イムノプロットングを行った。

(倫理面での配慮)

該当事項なし。

### C. 研究結果

(1) MA と相互作用する aaRS に関して：MA と相互作用し、野生型、変異体、復帰変異体の銀染色図で差が認められた宿主タンパク質としてアミノアシル tRNA シンセターゼ (aaRS) 超分子複合体 (aaRSC) を構成する一群の aaRS が同定された。野生型、変異体 (L20K)、復帰変異体 (L20K/E73K/A82T) それぞれの MA と相互作用する aaRSC の量はウイルス増殖能を反映し、野生型>復帰変異体>変異体という結果になった (図1)。つぎに、MA 強制発現細胞を細胞質、膜/オルガネラ、核、細胞骨格画分に分画したところ、aaRSC は細胞質画分に存在していることがわかり、MA と aaRSC との相互作用は細胞質で起きていることが示唆された (図2)。また、RNase A 処理により、MA と相互作用する aaRSC 量の大幅な減少が確認された (図3)。さらに、MA の RNA 結合領域として報告されている 25~27 番目のリジンを全てアラニンに置換し、MA の RNA 結合能を著しく欠損させると、MA と aaRSC との相互作用がほとんど検出されなかった (データ省略)。以上の結果は、MA は RNA を介して aaRSC と相互作用している可能性を示唆している。

MA と aaRSC との相互作用がウイルス増殖においてどのような役割を演じているかを解析を行うにあたり、我々は aaRSC に Lysyl tRNA Synthetase (LysRS) が含まれていることに着目した。LysRS は HIV-1 逆転写反応のプライマーとして使用される tRNA<sup>Lys3</sup> のウイルス粒子への取り込みに関与することが報告されている。L20K 変異がウイルス DNA 合成に欠損を生じさせることを鑑み、野生型と L20K 変異体ウイルス粒子への tRNA<sup>Lys3</sup> の取り込み量を比較した。その結果、両者において差は認められず、MA と aaRSC との相互作用はウイルス粒子への tRNA<sup>Lys3</sup> の取り込みに関与していない

ことが示唆された。次に、MA と相互作用している aaRSC が HIV-1 逆転写反応のプライマー供給に参与する可能性について検討した。その予備的実験として、強制発現させた MA と相互作用している宿主因子複合体中での tRNA<sup>Lys3</sup> の有無を解析した。その結果、この複合体中に tRNA<sup>Lys3</sup> が含まれ、その量は MA と相互作用している aaRSC の量と相関することがわかった。この結果は、この tRNA<sup>Lys3</sup> は aaRSC 中の LysRS と相互作用していることを示唆している。

(2) VLP、成熟ウイルス粒子を用いて調製されたウイルスコアによる MA 変異体の解析：成熟ウイルス粒子からのウイルスコアの調製を3つの MA 変異体 (V6R、L49D、C86S) とそれらの復帰変異体 (V6R/K97E、V34I/L49D、Q27K/C86S) について行った。その結果、いずれの変異体においても MA のコアへの界面活性剤耐性の親和性の増大が認められた (図4)。その中で、C86S のみその感染性の回復と MA の界面活性剤への感受性の回復が観察された (図5)。VLP から調製したコアを用いた実験から、L49D における gp41CT を介した Gag との相互作用の増強が認められ、復帰変異体 V34I/L49D ではその増強は解除されていた (図6)。

#### D. 考察

(1) MA と aaRS との相互作用のウイルス学的意義については、その前期過程における役割 (例えば逆転写過程へのプライマーの補充など) を検討中である。

(2) C86S については MA のコアへの界面活性剤耐性の親和性の増大がどのように膜融合直後の過程に欠損を生じさせているかさらなる解析が必要である。

#### E. 結論

(1) 野生型 MA と逆転写過程に欠損を有する変異体との結合親和性の差から同定された aaRS と MA の相互作用の強さは、野生型 > 復帰変異体 (L20K/E73K/A82T) > 変異体 (L20K) となり、ウイルス増殖能を反

映していた。また、その相互作用は RNA を介し、主に細胞質で起こっていることが示唆された。

(2) MA 変異体 C86S の膜融合直後の過程における欠損には、MA のコアへの界面活性剤耐性な親和性の増大が参与している可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

T. Murakami, and N. Yamamoto. AIDS: How Do We Overcome This Social or Biodisaster (Review)?

The Journal of Disaster Research, In press, 2007

##### 2. 学会発表

1. T. Murakami, E. Yasutomi, S. Ablan, K. Miyakawaa, J. Komano, Z. Matsuda, E. O. Freed, and N. Yamamoto. Detailed analyses of HIV-1 matrix mutants: Effects on an early stage of infection. November 12-15, 2006, 7<sup>th</sup> Annual Symposium on Antiviral Drug Resistance, Chantilly, Virginia, USA.

2. 篠田知宏、村上 努、安富英理子、真鍋美奈子、宮内浩典、駒野 淳、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同定。日本ウイルス学会、名古屋、2006年11月19-21日

3. 村上 努、大隈 和、熊倉 成、田中礼子、谷中幹郎、田中勇悦、山本直樹。新規 CXCR アンタゴニスト KRH-3166 は経口投与可能な高 HIV-1 剤である。日本エイズ学会、東京、2006年11月30-12月2日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

該当事項なし

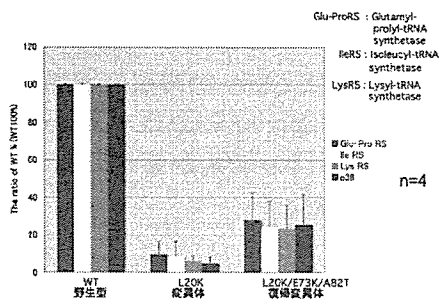


図1. aaRS と MA との相互作用（野生型、変異体、復帰変異体）

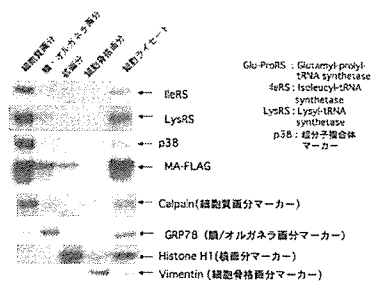


図2. MA と aaRS の細胞内局在

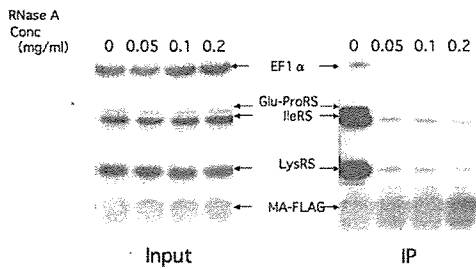


図3. RNase 処理による MA と aaRS との相互作用への影響

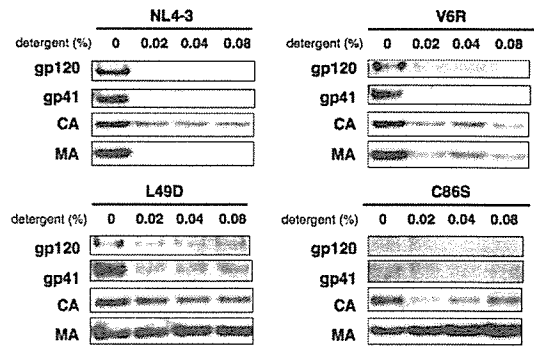


図4. Mature virions からの Core の調製（変異体）

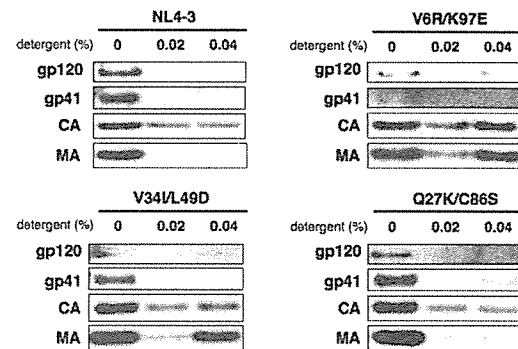


図5. Mature virions からの Core の調製（復帰変異体）

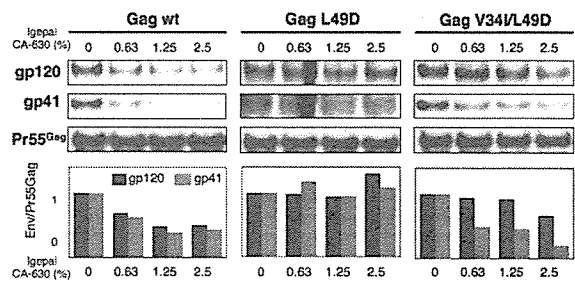


図6. Immature VLP における Env 保持に対する界面活性剤濃度の影響

平成 18 年度厚生労働省科学研究補助金 エイズ対策研究事業  
分担研究報告書

研究課題：HIV-1 ゲノム動態に関与する宿主因子

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・免疫治療学分野・助教授）  
研究協力者：西辻裕紀（エイズ予防財団・リサーチレジデント）

研究要旨

昨年度、我々は HIV-1 インテグラーゼに結合新規宿主因子として Gemin2 を同定した。Gemin2 は感染細胞に吸着／侵入後すみやかにインテグラーゼを介してウイルスゲノムと相互作用し HIV-1 の逆転写過程の進行をサポートしていることを報告した。Gemin2 は SMN 複合体の構成因子のひとつとして、snRNP のアセンブリーと核内輸送に関与していることおよび、スプライシングバリエーションとして、いくつかのアイソホーム( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )が存在することが知られている。本年度は、SMN 複合体および Gemin2 アイソホームの HIV-1 複製における機能的関与の有無明らかにすることを目的とした。各構成因子あるいはアイソホーム特異的 siRNA を用いた解析より、HIV-1 の複製には、Gemin2 は SMN 複合体としての機能ではなく、単独あるいは未知の複合体として機能することを確認した。さらに、細胞株では Gemin2  $\alpha$ が、ヒト抹消血単核球由来マクロファージにおいては Gemin2  $\gamma$ が HIV-1 複製に関与するという、細胞により Gemin2 アイソホーム依存性が異なることが明らかになった。

A. 研究目的

我々は HIV-1 インテグラーゼに結合しウイルスゲノムの逆転写過程に寄与する新規宿主因子として Gemin2 を同定した。Gemin2 は SMN 複合体を形成する構成因子のひとつである。また、Gemin2 には少なくとも、3 種のスプライシングバリエーションすなわちアイソフォーム（が存在する。本研究では、SMN 複合体および Gemin2 アイソホームの HIV-1 複製における機能的関与の有無明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

- 1) SMN 複合体を構成する各因子 (SMN, Gemin2, Gemin3, Gemin4, Gemin6) に対する特異的 siRNA を用い、各 SMN 構成因子を knock-down させ、HIV-1 複製への影響を検討した。
- 2) Gemin2 アイソホーム( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) の発現プロファイル RT-PCR 法により検討した。
- 3) 各 Gemin2 アイソホーム( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) FLAG-タグを発現ベクターを構築し HIV-1 インテグラーゼとの結合能を共免疫沈降法により評価した。
- 4) 各 Gemin2 アイソホーム( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) に対する特異的 siRNA を用い、各 SMN 構成因子を

knock-down させ、HIV-1 複製への影響を検討した。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮：該当事項無し。

C. 研究結果

- 1) SMN 複合体を構成する各因子 (SMN, Gemin2, Gemin3, Gemin4, Gemin6) を knock-down させた細胞において、HIV-1 の感染を有意に低下させたのは Gemin2 と SMN であった (図 1)。しかしながら、SMN を低下させた細胞では、Gemin2 をはじめとする SMN 複合体構成因子も顕著に低下させていた。
- 2) HeLa 細胞では Gemin2 アイソホーム  $\alpha$  が、また、ヒト抹消血単核球由来マクロファージでは各 Gemin2 アイソホーム( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) が有意に発現していた。
- 3) Gemin2 各アイソホーム( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) は細胞内で HIV-1 インテグラーゼと共沈した。
- 4) HeLa 細胞では Gemin2 $\alpha$  を knock-down した時のみ、HIV-1 の感染性が低下した。一方、マクロファージでは、Gemin2 $\alpha$  および Gemin2 $\gamma$  の両者を knock-down した時のみ、HIV-1 の感染性が低下したが、Gemin2 $\alpha$  および Gemin2 $\beta$  の両者を knock-down した時 HIV-1 の感染低下は認められなかった (図 2)。



#### D. 考察

HIV-1 インテグラーゼと結合する新規宿主因子として同定した Gemin2 は、SMN 複合体の構成因子の一つとして知られている。本研究結果から、Gemin2 は HIV-1 感染をサポートする際には、SMN 複合体としての機能ではなく、Gemin2 単独あるいは、未知の因子との相互作用によるものであることが示唆された。また、Gemin2 には少なくとも、3 種のスプライシングバリエーションすなわちアイソフォームが存在し、いずれも HIV-1 インテグラーゼとの相互作用が確認された。一方、ヒト抹消血単核球由来初代培養細胞と細胞株とでは、明らかに Gemin2 アイソフォームの発現プロファイルが異なっており、HIV-1 複製に関するアイソフォームには細胞依存性が存在することが判明した。今後は、こうした、ヒト抹消血単核球由来初代培養細胞間での違いを解析し、生体内での HIV-1 複製における Gemin2 の各アイソフォームの関与を詳細に解析することが重要であると考察される。

#### E. 結論

- 1) Gemin2 は SMN 複合体としての機能を介してではなく、単独あるいは未知の宿主因子との相互作用により HIV-1 の複製に関する。
- 2) IN は Gemin2 の各アイソフォーム ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) と結合できる。
- 3) HeLa 細胞とヒト抹消血単核球由来マクロファージでは Gemin2  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  すべてが発現プロファイルも異なっており、HeLa 細胞では Gemin2  $\alpha$ 、ヒト抹消血単核球由来マクロファージでは Gemin2  $\gamma$  が HIV-1 の複製に関する。

#### F. 健康危険情報

特記すべきこと無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Nishitsuji, H., M. Kohara, M. Kannagi, and T. Masuda. 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**:7658-66, 2006.

- 2) Komori, K., A. Hasegawa, K. Kurihara, T. Honda, H. Yokozeki, T. Masuda, and M. Kannagi. 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**:7375-81, 2006.

- 3) Hamamoto, S., H. Nishitsuji, T. Amagasa, M. Kannagi, and T. Masuda. 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.

- 4) Nomura, Y., T. Masuda, and G. Kawai. Structural Analysis of a Mutant of the HIV-1 Integrase Zinc Finger Domain That Forms a Single Conformation. *J Biochem (Tokyo)* **139**:753-9, 2006.

- 5) 増田貴夫 HIV-1 ゲノム動態に関する新規宿主因子群とその制御。ウイルス **56**: 41-50, 2006.

- 6) Kurihara, K., Y. Shimizu, A. Takamori, N. Harashima, M. Noji, T. Masuda, A. Utsunomiya, J. Okamura, and M. Kannagi. 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.

- 7) Kubo, M., H. Nishitsuji, K. Kurihara, T. Hayashi, T. Masuda, and M. Kannagi. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by arginine deiminase of *Mycoplasma arginini*. *J Gen Virol* **87**:1589-93, 2006.

##### 2. 学会発表

- 1) 増田貴夫 HIV-1 インテグラーゼとゲノム動態. 第3回ウイルス学キャンプ in 湯河原 2006 (湯河原)
- 2) 西辻裕紀, 小櫃冨未, 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 Gemin 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 (名古屋).

3) 西辻裕紀, 小櫃冨未, 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Gemin 2 アイソタイプの役割. 第54回日本ウイルス学会 2006 (名古屋).

4) 林隆也, 古川裕之, 西辻裕紀1, 増田貴夫, 神奈木真理. HIV-Nef による自然免疫系からのサイトカイン産生抑制. 第54回日本ウイルス学会 2006 (名古屋).

5) 神澤範行, 西垣一男, 林隆也, 新納亜也子, 石井雄一, 古川聡一, 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 a/X および a/X はNF-kB 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 2006 (名古屋).

6) 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 2006 (名古屋).

7) 西辻裕紀, 小櫃冨未, 林隆也, 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Gemin 2 の役割. 第20回日本エイズ学会、2006 (東京).

8) 林隆也, 古川裕之, 西辻裕紀1, 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-Nefの影響. 第20回日本エイズ学会、2006 (東京).

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

該当無し

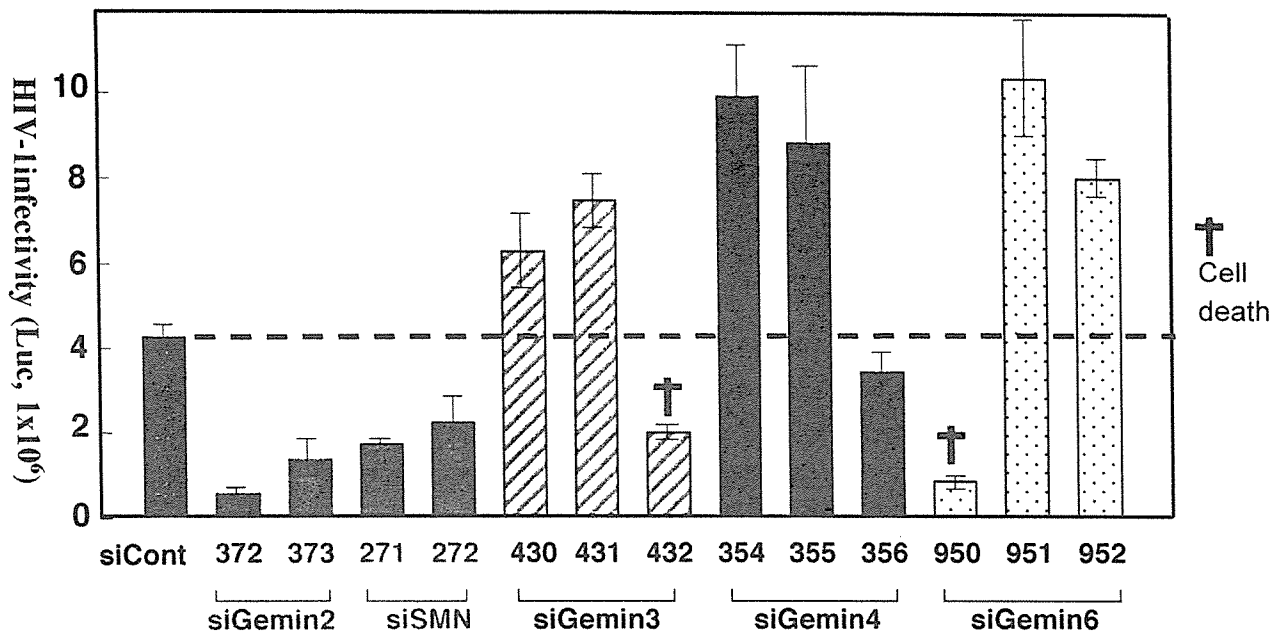


図1 SMN複合体各構成因子のHIV-1複製への関与

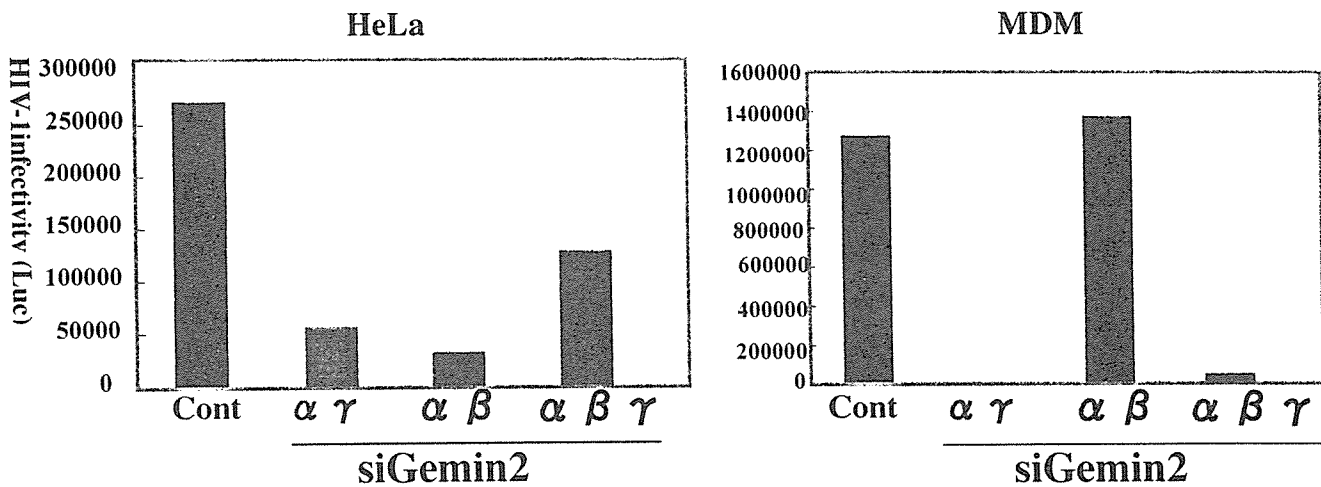


図2 Gemin2アイソタイプのHIV-1複製への関与

間 陽子 (理化学研究所)

これまでに我々は、Vpr が Imp $\alpha$ のみを介して核移行する新規核移行機序を有することを発見した。本研究では、immunodepletion および siRNA を用いて、Vpr の核移行に Imp $\alpha$ が必須である事を証明した。さらに、Imp $\alpha$ との結合能が消失した Vpr 変異体は核移行能を失い、それを組み込んだウイルスは複製が阻害されることを見出した。以上の結果は、Vpr と Imp $\alpha$ の結合が核移行とウイルス複製に必須であること、そして、その結合を標的とした新規抗 HIV-1 薬の開発の可能性を強く示唆している。そこで、Vpr と Imp $\alpha$ との結合を阻害する低分子化合物の検索を行った。まず、大量精製した GST と His tag 融合 Vpr および Imp $\alpha$ を用いて、Vpr と Imp $\alpha$ との結合を正確、簡便および高感度に検出するための ELISA 法を構築した。この ELISA 法を用いて、2000 化合物からスクリーニングして、Vpr と Imp $\alpha$ の結合を阻害する低分子化合物 49 種を選択した。その内 11 種の化合物が、GST pull down 法において Vpr と Imp $\alpha$ の結合を、2 種類が *in vitro* 核移行解析において Vpr の核移行を、1 種類がマクロファージにおけるウイルス感染を阻害した。現在、大規模スクリーニングと化合物の最適化のために Vpr と Imp $\alpha$ 複合体の X 線結晶構造解析を進めている。

## 1. 研究目的

HIV-1 の特徴の一つが他のレトロウイルスとは異なりマクロファージなどの非分裂細胞に感染できる点である。それは、HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr が Pre-integration complex (PIC)を核内に移行させるためと考えられる。我々は以前に、Vpr が一般的に行われる核輸送担体 Imp $\alpha/\beta$ による核移行とは異なった Imp $\alpha$ のみによる新規核移行機序によって核移行することを発見した。さらに、複数ある Imp $\alpha$ の isoform の内、主要な isoform (Rchl, Qipl, NPI-1)が Vpr と結合し、Vpr の核移行を促進すること、いずれの isoform も末梢血単核球および静止期 CD4<sup>+</sup>T 細胞より、最終分化マクロファージおよび活性化 CD4<sup>+</sup>T 細胞において高い発現が認められることを見出した。さらに、これらの細胞質画分を用いて核移行解析を行った結果、Vpr の核移行の促進効果は、Imp $\alpha$ の発現量と比例することが示唆された。

そこで、本研究では、Imp $\alpha$ の発現、また、Vpr と Imp $\alpha$ の結合が Vpr の核移行およびマクロファージへの HIV-1 感染に必須である事を立証した。さらに、新規抗 HIV-1 薬の開発を目指して、低分子化合物ライブラリーから Vpr と Imp $\alpha$ の結合を阻害する低分子化合物のスクリーニングを行った。

## 2. 研究方法

GSTとGFP融合野生型および変異体Vpr蛋

白質およびSV40 T NLSを用いて、*in vitro*核移行解析、蛍光バイオイメージング法およびBlue Native PAGEを行った。また、GFP融合野生型および変異体Vpr蛋白質およびSV40 T NLSを用いて、GST pull-down法を行った。健康なドナー由来末梢血リンパ球からMACS systemを用いて単球を分画し、AB serum と M-CSF含有培地で活性化したものをマクロファージとした。さらに、Imp $\alpha$ の3つの isoformを認識する抗体を用いて、マクロファージの細胞質画分から Imp $\alpha$ を immunodepletionした。NF462およびJR-CSF由来HIVをマクロファージに感染させ、ウイルス量を p24ELISA法で測定した。細胞傷害性試験はミトコンドリアの活性を指標とする MTT法によってCD4陽性Molt4細胞を用いて検証した。低分子化合物をスクリーニングするために、GST-Vprと Imp $\alpha$ -Hisを用いて ELISA binding assayを構築した。また、siRNAを用いてHeLa 細胞から Imp $\alpha$  1, 3および5をノックダウンした。

## 3. 研究結果

### 1)Vpr の核移行に Imp $\alpha$ が必須である：

これまでに我々は、Vpr の核移行能と Imp $\alpha$ の発現量が比例していることを明らかにした。そこで、Imp $\alpha$ の高い発現が認められ、Vpr が効率的に核移行する事が明らかになっている最終分化マクロファージにおいて、Imp $\alpha$ が Vpr の核移行に必須か否かを検証し

た。最初に、Imp $\alpha$  1 を認識する抗体を用いて、マクロファージの細胞質画分から Imp $\alpha$  を immunodepletion し、その細胞画分を用いて、*in vitro* 核移行解析を行った結果、Vpr の核移行は Imp $\alpha$  の存在量が減少した細胞質画分で激減した。次に、siRNA を用いて Imp $\alpha$  1, 3 および 5 をノックダウンした HeLa 細胞の細胞質画分を用いて *in vitro* 核移行解析を行った結果、Vpr の核移行は著しく減少した。一方、Imp $\beta$  のノックダウンでは Vpr の核移行能に変化は認められなかった。Immunodepletion および siRNA の結果から、Vpr の核移行に Imp $\alpha$  が必須であることが証明された。

#### 2) マクロファージにおける HIV-1 感染に Imp $\alpha$ が必須 :

HIV-1 感染における Imp $\alpha$  の重要性を Imp $\alpha$  との結合能が消失した Vpr 変異体を用いて解析した。蛍光バイオイメージング解析および *in vitro* 核移行解析により、Imp $\alpha$  との結合能を失った変異体  $\alpha$ LA は核移行能を消失していた。さらに、それを組み込んだ NF462 ウイルスはマクロファージにおいて複製が著しく激減したことから、マクロファージにおける HIV-1 感染には Imp $\alpha$  が必須である事が明らかとなった。さらに、新規抗 HIV-1 の標的として、Vpr と Imp $\alpha$  の結合の阻害が考えられた。

#### 3) ELISA binding 法の構築:

以上の結果から、新規抗 HIV-1 薬を開発するために、Vpr の Imp $\alpha$  の結合を阻害する低分子化合物をスクリーニングした。まず、スクリーニングに用いるための ELISA 法を構築した。96 穴プレートに、抗 GST 抗体を固相化させ、精製した GST-Vpr、さらに Imp $\alpha$ -His を結合させ、HRP 標識抗-Imp $\alpha$  抗体を反応後に基質で発色させ、450nm の吸光度を測定した。最初に、最適な GST-Vpr と Imp $\alpha$  のタンパク質量を決定した。

次に、構築された系が、阻害効果を正確に測定出来るか否かを、Imp $\alpha$  と結合し、Vpr の Imp $\alpha$  への結合を競合的に阻害する核輸送担体 Imp $\beta$  を添加することによって調べた。Imp $\beta$  の添加により量依存的に、Vpr と Imp $\alpha$  の結合が阻害されたことから、構築された系が Vpr と Imp $\alpha$  の結合阻害を正確に測定できることが確認された。

#### 4) ELISA binding 法による低分子化合物のスクリーニング:

構築した系を用いて、2000 種類の低分子

化合物ライブラリーのスクリーニングを行った結果、Vpr の Imp $\alpha$  の結合を阻害する 49 種類の低分子化合物をスクリーニングした。

#### 5) GST pull-down 法による Vpr と Imp $\alpha$ の結合を阻害する低分子化合物の同定 :

ELISA 法によりスクリーニングした 49 種類の低分子化合物の内 11 種類が、GST pull down 法によって Vpr の Imp $\alpha$  の結合を阻害することが再確認された (図 1 および表 1)。

#### 6) *in vitro* 核移行解析による低分子化合物の核移行阻害効果の確認 :

Vpr と Imp $\alpha$  の結合を特異的に阻害した 11 種類の低分子化合物の、Imp $\alpha$  を介した Vpr の核移行に対する効果を、*in vitro* 核移行解析によって検討した。Vpr は Imp $\alpha$  存在下で速やかに核内に移行するが、2 種類の低分子化合物の添加によって、その核移行は完全に阻害された (図 1 および表 1)。

#### 7) classical な核移行に対する低分子化合物の効果の確認 :

同定された化合物が、細胞内で主に作動している classical な NLS の核移行に及ぼす効果を解析した (図 2)。化合物は、GST pull down において NLS と Imp $\alpha$  の結合を、*in vitro* 核移行解析によって、NLS の核移行を阻害しなかった。従って、同定された化合物は、Vpr と Imp $\alpha$  の結合および核移行を特異的に阻害することが示唆された。

#### 8) 細胞傷害性試験による低分子化合物の細胞傷害性の確認 :

細胞傷害性をミトコンドリアの活性を指標とする MTT 法に測定し、化合物 2 の細胞傷害性が低いことが明らかとなった (表 1)。

#### 9) HIV-1 感染実験による阻害効果の判定 :

同定された化合物がマクロファージにおける HIV-1 感染を阻害できるか否かを、p24ELISA 法を用いた感染実験で解析した。感染後 4 日と 8 日において、化合物 1 は濃度依存的なウイルス複製阻害が観察された。また、化合物 2 は感染 8 日後においては最大で、70% の阻害効果が認められた (表 1)。

#### 10) 化合物は Vpr と結合する:

同定された化合物が、Vpr と Imp $\alpha$  のどちらに結合するかを Blue NATIVE PAGE を用いて解析した結果、化合物は Vpr に結合しスミア状にシフトしていることが確認された (図 3)。

#### 4. 考察

Vpr と Imp $\alpha$  との結合を阻害する低分子化

化合物が Vpr の核移行とマクロファージにおけるウイルス感染をも阻害したことから、Vpr と Imp  $\alpha$  の結合を標的にすることで、新たな抗-HIV-1 医薬の開発が可能であることが強く期待された。

より低濃度でVprの核移行を阻害できる化合物を開発するために、再度の大規模スクリーニングと化合物の最適化が必要である。

本研究は、ウイルスタンパク質と細胞内因子との結合を阻害するウイルス感染阻害薬のモデルとなると同時に、核内で複製する他のウイルスの核移行および感染阻害のモデルともなる。このように宿主因子との接点を標的にすることは、HIV-1 特有の遺伝子変異を回避する上でも有効である。

## 5. 結論

- 1) Vpr の核移行およびマクロファージにおける HIV-1 感染に Imp  $\alpha$  が必須であることを証明した。
- 2) Vpr の Imp  $\alpha$  との結合が新規創薬の標的になることを発見した。
- 3) Vpr と Imp  $\alpha$  の結合阻害を標的として、2000 低分子化合物をスクリーニングした結果、ELISA binding 法によって、Vpr と Imp  $\alpha$  の結合を阻害する 49 種類が、GST pull down 法によって、11 種類が同定された。その内、2 種類は Imp  $\alpha$  によって促進される Vpr の核移行を、さらに 1 種類はマクロファージにおけるウイルス感染を阻害した。

## 6. 研究発表

### 1) 論文発表

- ① Azuma A., Matsuo A., Suzuki T., Kurosawa T., Xiangfeng Z and Aida Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces cell cycle arrest at the G<sub>1</sub> phase and apoptosis via disruption of mitochondrial function in rodent cells. *Microbes Infect.* 8:670-679, 2006.
- ② Nitahara-Kasahara Y., Kamata M., Yamamoto T., Zhang X., K., Miyamoto Muneta Y, Iijima S., Yoneda Y., Tsunetsugu-Yokota Y. and Aida Y. "A novel nuclear import mechanism of Vpr promoted by importin  $\alpha$  is crucial for HIV-1 replication in macrophages", *J. Virol.*, in press.
- ③ Hashizume C., Kuramitsu M., Zhang X., Kurosawa T., Kamata M. and Aida Y. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts via interaction with spliceosome-associated protein SAP145 to mediate cellular pre-mRNA splicing inhibition. *Microbes Infect.*, in press.

### 2) 学会発表

- ① Zhang X., Kuramitsu M., Kimata K., Yamamoto N., Yamamoto N., Tanaka Y and Aida Y.: Regulation of HIV-1 viral products expression by Vpr : a novel role on HIV-1 pre-mRNA splicing, Meeting on Retroviruses 2006, Cold Spring Harbor Laboratory, March (2006).
- ② Hashizume C., Kuramitsu M., Isogai M., Kamata M., Azuma A. and Aida A.: Vpr interacts with spliceosome-associated protein 145 (SAP145) and regulates splicing reaction, Meeting on Retroviruses 2006, Cold Spring Harbor Laboratory, March (2006).
- ③ Matsuda G., and Aida Y.: Characterization of the nucleolar localization and nuclear export of HIV-1 nucleocapsid protein (NCp7), RIKEN International Symposium on Chemical Biology 2007, Fuji-Hakone, January (2007).
- ④ 鈴木辰徳、山本典生、山本直樹、間陽子：HIV-1 Vpr と Importin  $\alpha$  の結合を阻害する低分子化合物によるVpr 核移行とウイルス複製の阻害、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋、11月 (2006年)
- ⑤ 張陰峰、山本典生、田中勇悦、山本直樹、間陽子：Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 pre-mRNA splicing by Vpr enhances viral production、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋、11月 (2006年)
- ⑥ 松田剛、間陽子：HIV-1 nucleocapsid protein (NCp7) の核小体および核外への移行能、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋、11月 (2006年)
- ⑦ 佐藤正明、竹嶋伸之輔、間陽子：ウシ白血病ウイルス (BLV) の白血病発症に抵抗性と感受のBoLA-DRB3アリルが提示するBLVエピトープの検索、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋、11月 (2006年)
- ⑧ 竹嶋伸之輔、陳晶、宮武秀行、間陽子：進化的手法を用いたHIV-1 Vpr蛋白質の機能予測、日本ウイルス学会第54回学術集会、名古屋、11月 (2006年)
- ⑨ 鈴木辰徳、山本典生、山本直樹、間陽子：HIV-1 Vpr と Importin  $\alpha$  の結合を標的とする新規抗 HIV-1 薬の開発、第20回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、11月 (2006年)
- ⑩ 松田剛、間陽子：HIV-1 nucleocapsid protein (NCp7) の核外輸送能の解析、第20回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、11月 (2006年)
- ⑪ 竹嶋伸之輔、陳晶、宮武秀行、間陽子：“進化的手法を用いたHIV-1 Vpr 蛋白質の変異解析”、第20回日本エイズ学会学術集会・総会、東京、12月、(2006年)

8. 7. 研究危険情報 該当事項なし。

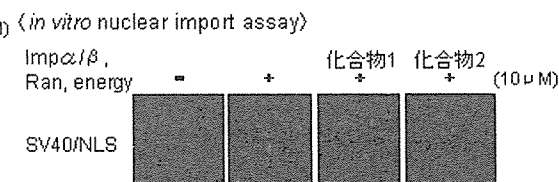
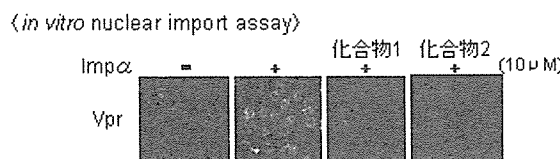
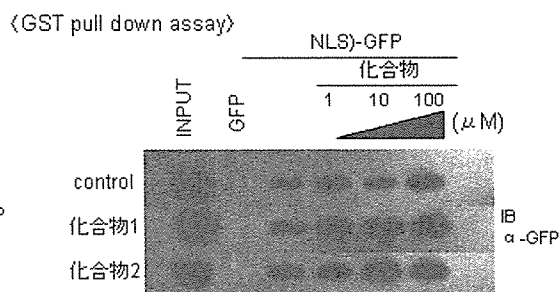
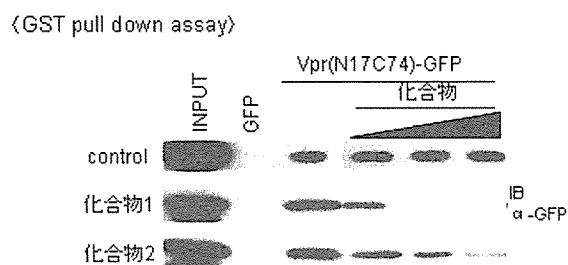


図1. 同定された化合物はVprとImpαの結合および核移行を阻害する

図2. 同定された化合物はNLSとImpαの結合および核移行を阻害しない

< Blue Native PAGEの利点 >

- ・等電点に左右されない
- ・タンパク質の三次元構造が維持される
- ・coomassieRG250の添加により泳動度がある程度分子の大きさを反映する。

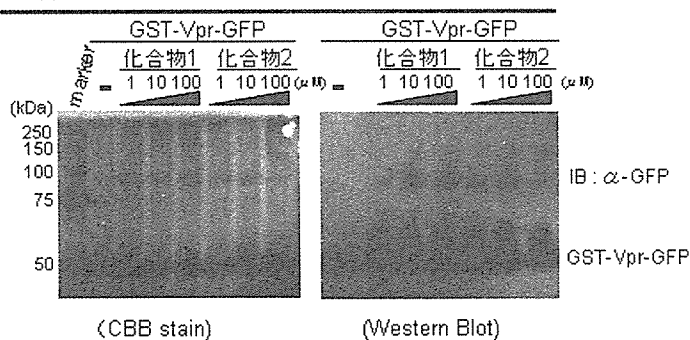


図3. 2つの化合物はVprに結合する -Blue Native PAGE-

表1. VprとImp αの結合を阻害する低分子化合物のスクリーニングのまとめ

方法	標的	陽性	陰性
ELISA binding assay	結合	49	1,951
GST pull-down assay	結合	11	38
Nuclear import assay	核移行	2	9
マイクロインジェクション法	核移行	現在解析中	
MTT assay	細胞傷害性	-	-
in vitro 感染実験	感染	1	1

リード化合物の最適化および大規模スクリーニング

## HIV-1 複製に関わる宿主因子の同定とその機能解析

**研究要旨** AIDS の病態進行とともに、HIV-1 感染者の CD38<sup>+</sup> T 細胞の割合が増加することが知られている。私達は、健常者の PBMC に由来する CD4<sup>+</sup> T 細胞を CD38 サブセットに分画し、HIV-1 トロピズムについて検討した結果、CD38<sup>+</sup>分画が X4 HIV-1 に高感受性を示し、これは IL-4 依存的であった。両サブセット間で X4 HIV-1 の吸着、侵入、インテグレーション過程には大きな違いは見られず、転写過程において差異が生じており、転写因子である AP-1 が IL-4 依存的に CD38<sup>+</sup>サブセットにおいて活性化されていた。そこで、両サブセットについて GeneChip 解析を行ったところ、IL-4 処理 CD38<sup>+</sup>サブセットで認められ、IL-4 未処理 CD38<sup>+</sup>サブセットと IL-4 処理 CD38<sup>-</sup>サブセットで認められないものとして約 20 遺伝子、逆に IL-4 処理 CD38<sup>-</sup>サブセットで認められ IL-4 未処理 CD38<sup>-</sup>サブセットと IL-4 処理 CD38<sup>+</sup>サブセットで認められないものとして 5 遺伝子を同定できた。そこで、本年度は、IL-4 処理 CD38<sup>-</sup>で認められた遺伝子群のうち RNF125 の HIV-1 複製への影響について解析を行った。また、「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」に参画し、ヒトマクロファージ細胞株である J111 で HIV-1 感染を亢進する宿主因子の検索およびその分子機序の解析を行った。

分担研究者 生田和良  
(大阪大学微生物病研究所・教授)  
協力研究者 亀岡正典、小路早苗、  
北川友紀子  
(大阪大学微生物病研究所)

### A. 研究目的

AIDS 病態機序には、HIV-1 の主な標的細胞である CD4<sup>+</sup> T 細胞のウイルス感受性（トロピズムと複製効率）が関わる。CD4<sup>+</sup> T 細胞は免疫機能によって、幾つかのサブセットに分けることができるが、各サブセット間の HIV-1 感受性の差異については不明な点が多い。私たちは、AIDS 病態進行とともに、CD38<sup>+</sup>/38<sup>-</sup> T 細胞比が上昇する点に着目し、CD4<sup>+</sup>の両サブセットが感受性を示す HIV-1 トロピズムについて検討し、CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> T 細胞サブセットが X4 HIV-1 に高感受性を示すこと、この違いには IL-4 刺激によって引き起こされるウイルス転写過程にあることを見出した。そこで、IL-4 処理および未処理

の両サブセットについて GeneChip 解析を行ったところ、IL-4 処理 CD38<sup>+</sup>サブセットでのみ認められたものとして 20 遺伝子、IL-4 処理 CD38<sup>-</sup>サブセットでのみ認められたものとして 5 遺伝子を同定することができた。そこで、本年度は、IL-4 処理 CD38<sup>-</sup>で認められた遺伝子群のうち RNF125 が HIV-1 複製に与える影響について解析を行った。また、「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」に参画し、ヒトマクロファージ細胞株である J111 で HIV-1 感染を亢進する宿主因子の検索およびその分子機序の解析を行った。

### B. 研究方法

非感染ドナーの PBMC から MACS を用いて、活性化マーカー CD25 陰性、HLA-DR 陰性の CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>および CD4<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>サブセットを分離し、IL-4 存在下で 3 日間培養を行った。培養後、total RNA を回収し、定量的 RT-PCR 法を行い、サブセット間の遺伝子発現を比較した。

HIV-1 LTR プロモーターに与える影響に



ついては、HIV-1 LTR の下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子と RNF125 発現プラスミドを cotransfection し、24 時間後にルシフェラーゼアッセイを行った。

HIV-1 タンパク質合成に与える影響については、HIV-1 proviral DNA (pNL4-3) と RNF125 発現プラスミドを cotransfection し、48 時間後に細胞上清中の p24 抗原を p24 ELISA により測定した。また、HIV-1 の RNA 合成については、pNL4-3 と RNF125 発現プラスミドを cotransfection し、48 時間後に細胞の total RNA を回収し、HIV-1 Nef に対するプローブで Northern blotting を行った。

一方、「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」については、J111 (ヒトマクロファージ由来株)、MAGIC5A、293T へそれぞれの siRNA を導入後、VSV-G シュード HIV-1 および pNL-BaL env 由来ウイルスを感染し、ウイルス産生における亢進または抑制能について検討した。

さらに、ウイルス複製の亢進が認められた因子については、HIV-1 複製前期過程への関与について複製段階ごとに解析を行った。ウイルス粒子の定量には p24 ELISA を、逆転写・インテグレーション段階の解析には PCR 法を用いた。

### C. 研究結果

ヒトゲノム遺伝子約 40,000 個の GeneChip 解析により、CD38<sup>+</sup>サブセットで IL-4 処理により発現亢進する因子として 20 遺伝子が、反対に CD38<sup>+</sup>サブセットで IL-4 処理により発現亢進する因子として 5 遺伝子が同定された。そこで、半定量的 RT-PCR 法による解析を進めたところ、これら因子のうち、前者で 8 遺伝子、後者で 3 遺伝子が確認された。本年度は、IL-4 処理 CD38<sup>+</sup>サブセットで発現の高い遺伝子群の 1 つ、RNF125 について詳細な解析を行った。

1) CD4<sup>+</sup> T 細胞を IL-4 で 3 日間刺激したところ RNF125 の発現が誘導されたが、

PHA の 3 日間処理では、この発現誘導は認められなかった。CD4<sup>+</sup> T 細胞を CD38<sup>+</sup> と CD38<sup>-</sup>サブセットに分画後に IL-4 で 3 日間刺激したところ、CD38<sup>+</sup>に比べ、CD38<sup>-</sup> T 細胞サブセットにおいて RNF125 のより顕著な発現が認められた。

- 2) RNF125 が HIV-1 増殖に影響を与える可能性について検討するため、RNF125 に対する siRNA を用いて細胞内の RNF125 タンパク質レベルを減少させた。その後組換え HIV-1 を感染させたところ、HIV-1 の増殖が上昇した。
- 3) HIV-1 のウイルスタンパク質産生に与える影響を検討した。HIV-1 proviral DNA と RNF125 を cotransfection したところ、細胞上清中に放出されるウイルス粒子のレベルが RNF125 の用量依存的に抑制された。
- 4) RNF125 はそのアミノ酸配列から RING domain を持っていることから、タンパク質のユビキチン化を進める E3 ligase であることが推定される。RING domain の最初のシステインもしくは一番目と二番目のシステインをアラニンに置換することで、E3 ligase 活性を欠失した変異体を作製できることが今までに報告されている。そこで、これらの変異体 (C37A および C37/40A) を作製し、HIV-1 proviral DNA と cotransfection を行ったところ、E3 活性を失った変異体は、細胞上清中へのウイルス粒子放出に抑制的には働かなかった。
- 5) HIV-1 proviral DNA と RNF125 を cotransfection した後、細胞内 HIV-1 RNA 量を調べたところ、RNF125 の用量依存的にウイルス RNA 量が減少していた。C37A では抑制されなかった。
- 6) HIV-1 LTR からの転写への影響をルシフェラーゼアッセイ法により検討したところ、RNF125 の用量依存的に HIV-1 LTR からの転写が抑制された。これはヒト付着細胞 293T とヒト T 細胞株 Jurkat の両

方において観察された。

- 7) E2 ligase である Ubc13 のタンパク質量を siRNA を用いて減少させた細胞、および Ubc13 plasmid を発現させてタンパク質量を増加させた細胞に、RNF125 と HIV-1 proviral DNA を cotransfection したところ、細胞上精中に放出されるウイルス粒子のレベルには変化がなかった。
- 8) 「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」については、J111 へ VSV-G シールド HIV-1 を感染する系においてウイルス産生を上昇させるものとして 4 遺伝子を同定した。その中には、これまでにウイルス複製後期過程への関与が報告されている adaptor-related protein complex-2 (AP-2) が含まれていた。
- 9) HIV-1 複製過程の各段階で AP-2 の関与を検討した結果、ウイルス吸着・侵入過程ではコントロール細胞と AP-2 siRNA 導入細胞間で吸着侵入ウイルス量に有意差は認められなかった。しかしながら、インテグレーションされた DNA 量は AP-2 siRNA 導入細胞で有意な上昇を認めた。

#### D. 考察

CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>サブセットは X4 HIV-1 に高感受性である。この高感受性には、HIV-1 のレセプターおよびコレセプターの発現が関わるウイルス吸着・侵入段階の促進ではなく、転写過程の亢進に基づいていた。GeneChip 法で同定した CD4<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>サブセット特異的宿主遺伝子産物は、X4 HIV-1 の転写に抑制的に働くと考えられる。実際、その遺伝子産物の 1 つである RNF125 は HIV-1 LTR プロモーターからの転写を抑制することが明らかになり、その抑制活性には RNF125 の RING domain が必須であった。このことから、RNF125 は HIV-1 LTR プロモーターに作用する様々な転写因子、もしくは、その転写因子のシグナル経路に関わる宿主因子をユビキチン化することによって、HIV-1 LTR からの転写を間接的に阻害していることが示唆さ

れた。さらに、E2 ligase の 1 つである Ubc13 の細胞内タンパク質量を変化させた場合、RNF125 による HIV-1 複製抑制に影響が見られないことから、RNF125 によりユビキチン化された標的タンパク質が、プロテアソームにより認識され、分解されることが考えられた。今後、RNF125 のユビキチン化標的分子を明らかにすることは、X4 HIV-1 複製機序の新たな機序解明につながると考えられる。

一方、「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」に関する結果については、HIV-1 複製後期過程への関与が報告されている AP-2 が、ウイルス侵入以降インテグレーションまでの過程でも HIV-1 複製を負に制御している新たな機能があると考えられた。今後 HIV-1 複製のどの過程において機能しているか、詳細な解析が必要である。

#### E. 結論

HIV-1 の標的である CD4<sup>+</sup> T 細胞のうち、CD38<sup>+</sup>サブセットは、IL-4 刺激により X4 HIV-1 の転写過程を亢進する因子を誘導し、一方 CD38<sup>-</sup>サブセットは、IL-4 刺激により X4 HIV-1 の転写過程を積極的に妨げる因子を誘導する。このうち、X4 HIV-1 の転写過程を積極的に妨げる因子の 1 つとして RNF125 を同定した。

「RNAi ミニライブラリーを用いた HIV-1 複製関連因子のスクリーニング計画」により、ウイルス侵入以降インテグレーションまでの過程で HIV-1 の複製を負に調節する因子として AP-2 を同定した。

#### F. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Warachit, J., Iwabu, Y., Li, Y.-G., Li, G.-M., Isarangkura, P., Ibrahim, M.S., Balachandra, K., Tsuji, S., Ikuta, K.: Aberrant life cycle of human immunodeficiency virus type 1

- CRF15\_01B-like clinical isolates from Thailand in human CD4<sup>+</sup> T-cell lines. *Microbes Infect.*, in press.
2. Iwabu, Y., Goto T., Tsuji S., Warachit J., Li G.M., Shoji S., Kameoka M., Ikuta K.: Superinfection of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) to cell clone persistently infected with defective virus induces production of highly cytopathogenic HIV-1. *Microbe Infect.* 8, 1773-1782, 2006.
  3. Komoto, S., Tsuji, S., Lee, B.J., Iwabu, Y., Kojima, Y., Otake, T., Taniguchi, K., and Ikuta, K.: Higher frequency of premature stop codon mutations at *vpu* gene of human immunodeficiency virus type 1 CRF01\_AE compared with those of other subtypes. *Microbes Infect.* 7, 139-147, 2005.
  4. Isarangkura, P.N.A., Li, G.M., Warachit, J., Iwabu, Y., Tsuji, S., Auwanit, W., Yamamoto, D., Goto, T., Hayashi, Y., Kiso, Y., and Ikuta, K.: Different susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to Env gp41-derived synthetic peptides corresponding to the two heptad repeat regions. *Microbes Infect.* 7, 356-364, 2005.
  5. Li, Y.G., Iwabu, Y., Warachit, J., Kinomoto, M., Ibrahim, M.S., Tsuji, S., Mukai, T., Kameoka, M., Tokunaga, K., Sata, T., and Ikuta, K.: Interleukin-4 upregulates T-tropic human immunodeficiency virus type 1 transcription in primary CD4<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> T-lymphocyte subset. *Microbiol. Immunol.* 49, 155-165, 2005.
  6. Kinomoto, M., Yokoyama, M., Sato, H., Kojima, A., Kurata, T., Ikuta, K., Sata, T., and Tokunaga, K.: Amino acid 36 in HIV-1 gp41 ectodomain control fusogenic activity: Implications for the molecular mechanism of viral escape from a fusion inhibitor. *J. Virol.* 79, 5996-6004, 2005.
  7. Yamamoto, D., Li, G.M., Ikuta, K., and Goto, T.: L(565)M mutation in HIV-1 glycoprotein 41 stabilizes the coiled-coil structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 112-116, 2005.
  8. Sakudo, A., Tsenkova, R., Onozuka, T., Morita, K., Li, S., Warachit, J., Iwabu, Y., Li, G., Onodera, T., and Ikuta, K.: A novel diagnostic method for human immunodeficiency virus type-1 in plasma by near-infrared spectroscopy. *Microbiol. Immunol.* 49, 695-701, 2005.
  9. Kameoka, M., Nukuzuma, S., Itaya, A., Tanaka, Y., Ota, K., Inada, Y., Ikuta, K., and Yoshihara, K.: Poly(ADP-ribose)polymerase-1 is required for integration of the human immunodeficiency virus type 1 genome near centromeric alphoid DNA in human and murine cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 412-417, 2005.
- 2) 学会発表
- 北川友紀子、亀岡正典、岩部幸枝、小路早苗、生田和良. ヒト細胞因子に対する siRNA library を用いた HIV-1 複製に関与する宿主因子の検索. 第 20 回日本エイズ学会.
- 岩部幸枝、Jiranan Warachit、小路早苗、水田浩之、亀岡正典、後藤俊之、生田和良. 非感染性粒子産生 HIV-1 持続感染細胞への AE 型重感染に基づく感染性粒子の出現機序. 第 54 回ウイルス学会.
- 小路早苗、亀岡正典、岩部幸枝、Sompong Sapsutthipas、生田和良. HIV-1 複製を負に制御する宿主因子の機能解析. 分子生物学会 2006 フォーラム.

## 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)

研究要旨： HIV 複製を転写レベルで負に制御する宿主転写因子 AP-4 は感染者体内で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、その結果潜伏感染の維持に重要な役割を演じ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. に発表した。)

### 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るため、ウイルスの複製が宿主転写制御機構に大きく依存する。逆転写の過程ではプロウイルス DNA 合成の際にゲノム RNA が RNase H によって分解されるため遺伝情報量の増大はおこらない。これまでの HIV 転写研究から、特に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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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。

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 転写の負のメカニズムに関しては不明な点が多い。HIV 発現の抑制機構が転

写レベルで明らかとなれば、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。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、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、Tat 被制御遺伝子を包括的に検索した結果、DNA 修復酵素である OGG1 を同定した。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