

ーンを Elispot など直接的に進めてゆくことが重要であると考え。さらに、我々は、彼らが認識する CTL エピトープの抗原発現効率に関する実験へと発展させてゆく予定である。

E. 結論

1) 十分なサンプルサイズの双方が感染した夫婦を対象にシーケンス情報と HLA 情報を得ることにより、CTL 免疫圧によってウイルスがどのように進化するのか、その方向性を示唆する情報が得られることが判明した。さらに、ウイルスにとって変化し難い CTL 免疫圧を明らかにすること出来ることから、今後 CTL ワクチンの標的とすべき CTL エピトープに関する情報が得られる可能性がある。

2) CTL 免疫圧によって生じる Gag タンパクのアミノ酸変異のなかに、B*57/B*58 に関連する T242 変異のように、感染者の臨床経過に良い影響を与えるものが存在することが判明した。このような知見も、将来 CTL ワクチンの標的とすべき CTL エピトープ情報に役立つ可能性がある。

3) 以上のことから、感染者の臨床経過に良い影響を与えるような CTL 免疫の分子レベルの特徴が明らかにに関する研究を継続することは、CTL 誘導型ワクチンの開発に役立つ情報を提供する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T. Effects of CCR2 and CCR5 Polymorphisms on HIV-1 Infection in Thai Females. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2008 Jan 11 (in press).

- 2) Saeng-Aroon S., Yoshida LM, Ariyoshi K, Taguchi M, Pathipvanich P, Rojanawiwat A, Matsuda M, Kannnagi M, Sawanpanyalert P, Sugiura W, Auwanit W. An Efficient Tool for Surveying CRF01_AE HIV Type 1 Resistance in Thailand to Combined Stavudine-Lamivudine-Nevirapine Treatment Mutagenically Separated PCR Targeting M184I/V. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 Dec; 23(12): 1461-8

- 3) Wichukchinda N, Kitamura Y, Rojanawiwat A, Nakayama EE, Song H, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, Ariyoshi K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2007 May;23(5):686-92.

- 4) Deforche K, Camacho R, Grossman Z, Silander T, Soares MA, Moreau Y, Shafer RW, Van Laethem K, Carvalho AP, Wynhoven B, Cane P, Snoeck J, Clarke J, Sirivichayakul S, Ariyoshi K, Holguin A, Rudich H, Rodrigues R, Bouzas MB, Cahn P, Brigido LF, Soriano V, Sugiura W, Phanuphak P, Morris L, Weber J, Pillay D, Tanuri A, Harrigan PR, Shapiro JM, Katzenstein DA, Kantor R, Vandamme AM. Bayesian network analysis of resistance pathways against HIV-1 protease inhibitors. *Infect Genet Evol*. 2007 Jun;7(3):382-90. Epub 2006 Nov 28.

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図1 夫婦間 CRF01AE 伝播後生じた Gag アミノ酸変異数 (Y 軸) と夫婦間の HLA アリールの相違数 (左図が HLA A アリール、右図が HLA B アリール)

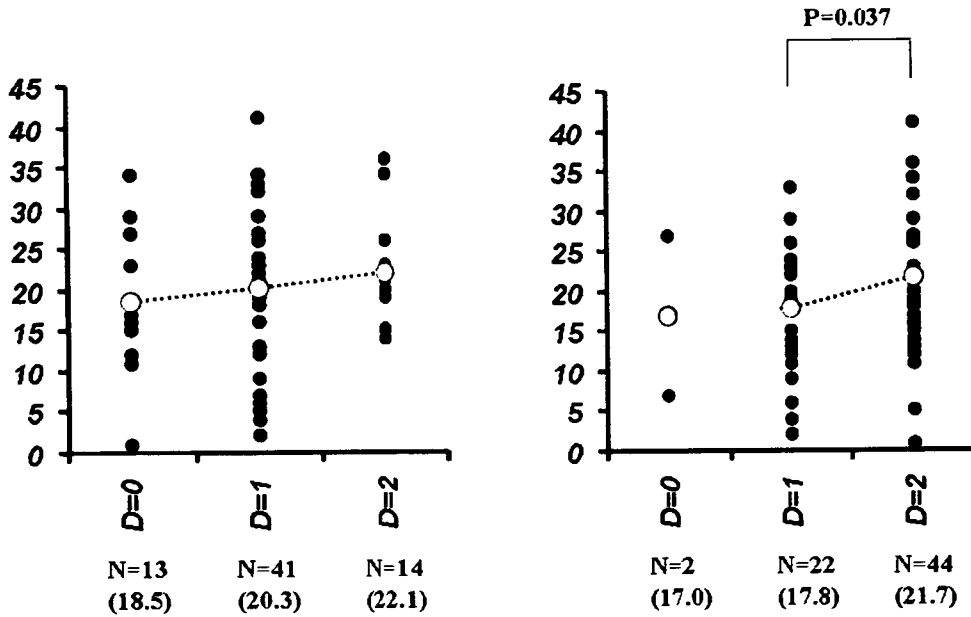


図2 各 HLA に相関する Gag アミノ酸変異における変異率 (Mutation rate) と復帰率 (Reversion rate) との関係: 点線は、変異率および復帰率の平均を示している; ■ は、この感染者集団のなかで、その HLA 圧によるアミノ酸変異が優勢配列になったものを示している

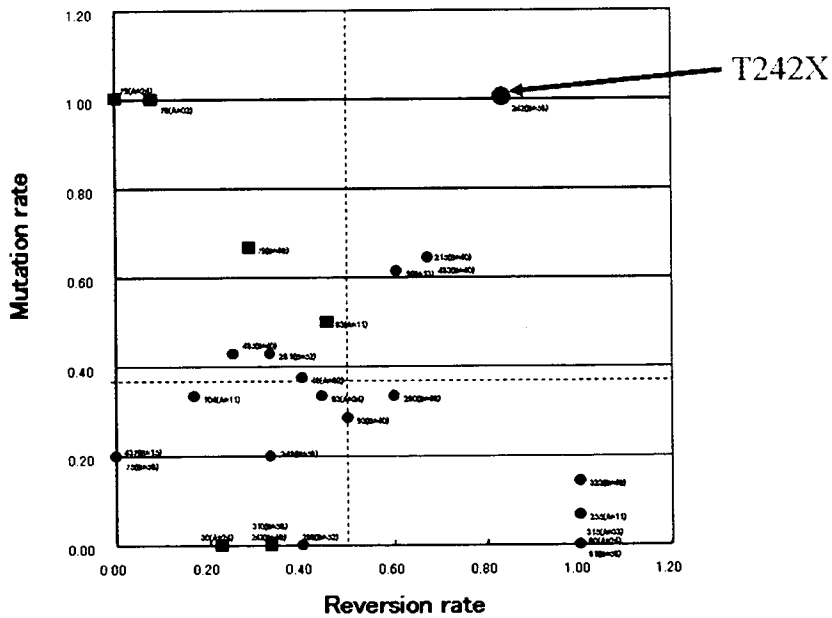


図3 高い CD4 値と低いウイルス量値と有意な相関のあった3つの HLA 相関 Gag アミノ酸変異(T242, V357, P485): 上段 Y 軸が CD4 値を下段 Y 軸はウイルス量を示す。

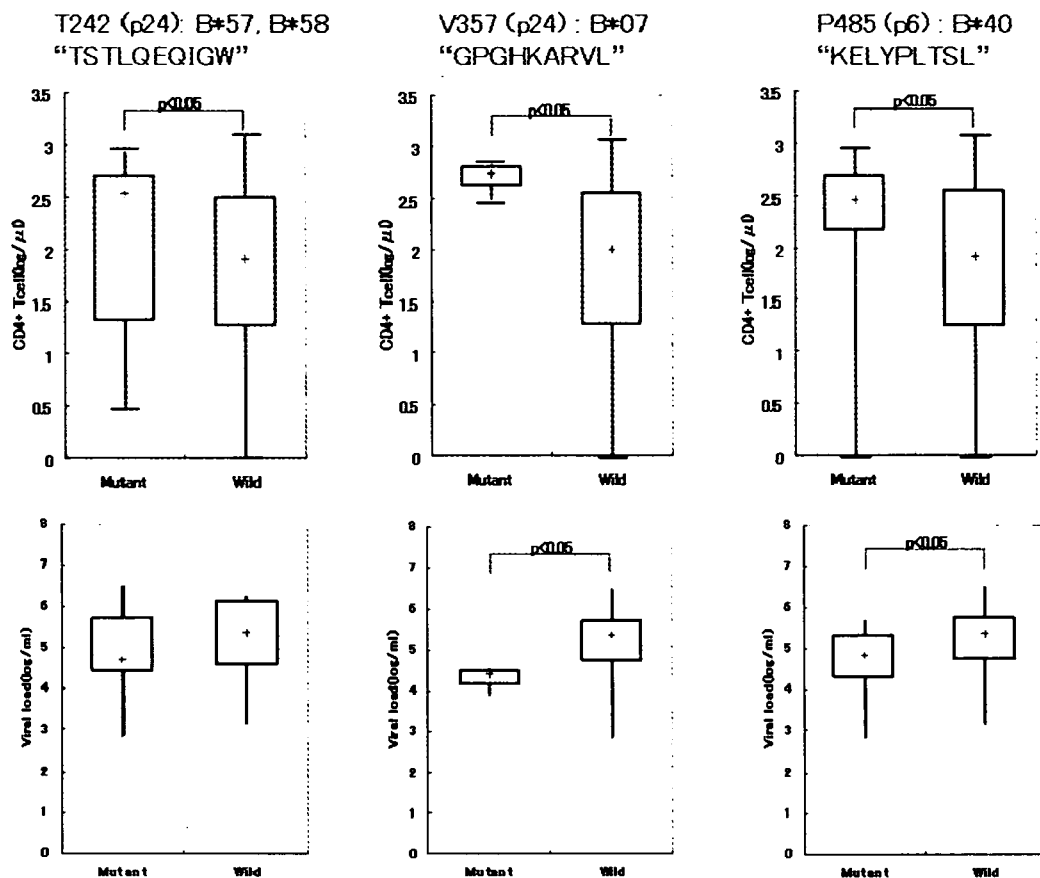


図4 HLA 相関 Gag アミノ酸変異の有無と生存曲線: 左図が T242 の有無、右図が P485 の有無で感染者を分類している

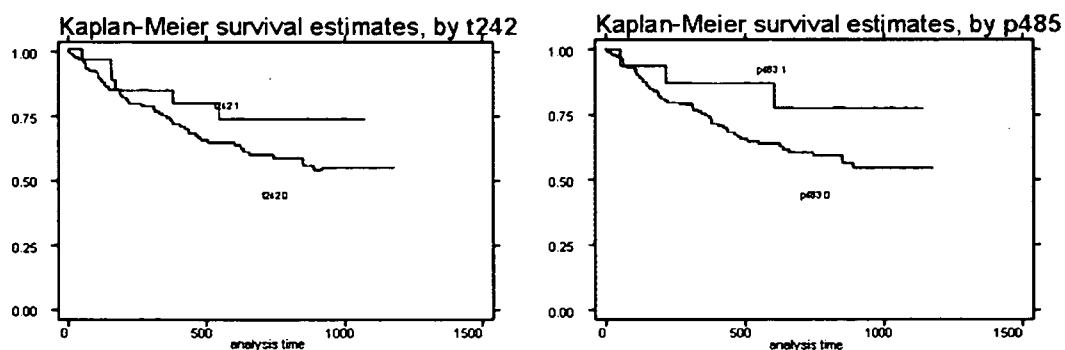
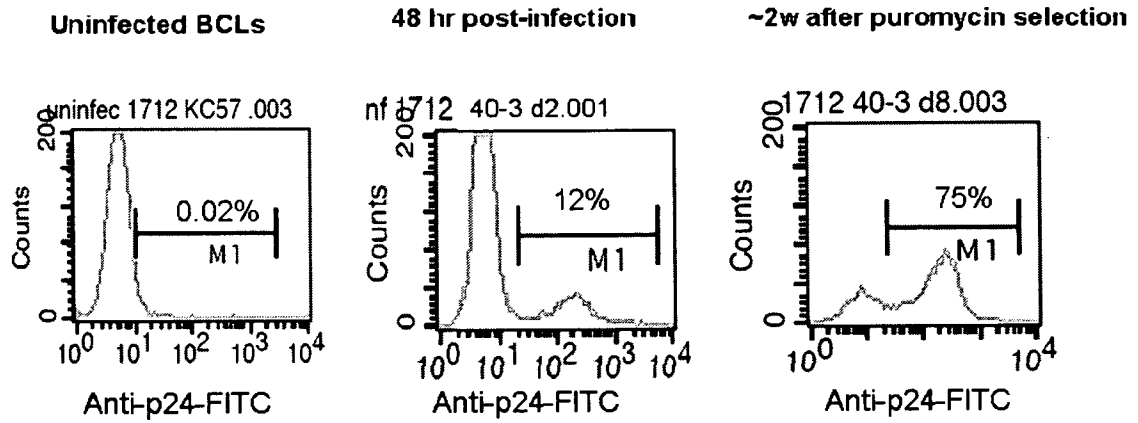


図5 VSVG タンパクを有する偽 HIV ウイルスに感染し、感染者由来 CRF01_AE Gag タンパクを発現する B 細胞ライン



感染前(左)、感染後 48 時間(真ん中)、感染後 puromycin 存在下で 2 週間培養後の抗 p24 抗体染めた B 細胞をフローサイトメリーにて検出;48 時間後には 12%の細胞が、2 週間の選択的培養にて 75%の細胞が Gag タンパクを産生している。

表1 異なる HLA 環境下へ伝播した場合の HLA 相関 Gag アミノ酸の変異

Part	Position (Restriction HLA)	HLA:		HLA:			
		Couple Num.	+ Index	- Contact	Couple Num.	- Index	+ Contact
p17	S9X (B*13)	10	T(6)	S(4)	12	S(11)	T(5)
			S(3)	T(2)		T(1)	S(4)
			A(1)	S(3)		T(1)	R(2)
	R30X (A*24)	11	R(9)	R(7)	5	R(4)	R(4)
			K(2)	K(2)		K(1)	Q(1)
				R(1)			
	L46X (A*02)	14	I(5)	I(3)	13	L(8)	L(5)
			L(9)	L(2)		I(4)	I(3)
				L(9)		V(1)	I(3)
	T53X (A*02)	14	T(13)	T(13)	13	T(12)	T(12)
			S(1)	T(1)		S(1)	S(1)
	A54X (A*02)	14	A(13)	A(11)	13	A(13)	A(9)
				S(1)			T(2)
			G(1)	T(1)			G(1)
	I60X (A*24)	11	I(7)	I(5)	5	L(3)	L(3)
			L(4)	L(2)		I(2)	I(2)
				I(4)			
	L75X (B*58)	7	L(5)	L(5)	5	L(5)	L(4)
			V(2)	V(2)			V(1)
K76X (A*02)	14	K(13)	K(12)	13	K(10)	K(10)	
		R(1)	R(1)		R(3)	K(3)	
F79X (A*24)	11	F(11)	F(11)	5	F(3)	F(2)	
					Y(2)	H(1)	
F79X (B*46)	12	Y(7)	Y(5)	10	F(7)	F(5)	
		F(5)	F(2)		Y(3)	Y(2)	
			F(5)			F(2)	
T81X (B*58)	7	T(4)	T(4)	5	T(5)	T(5)	
		A(1)	T(1)				
		V(1)	A(1)				
V82X (A*24)	11	I(5)	V(3)	5	V(3)	I(2)	
		V(5)	I(2)		I(2)	V(1)	
		L(1)	V(4)			I(1)	
V83X (A*11)	12	V(11)	V(6)	15	A(12)	A(6)	
		A(1)	A(5)		V(3)	V(6)	
			V(1)			V(2)	
V83X (A*24)	11	A(9)	A(5)	5	V(3)	V(2)	
		V(2)	V(4)		A(2)	A(1)	
			A(1)			A(2)	
E93X (B*40)	14	D(8)	D(4)	7	E(7)	E(5)	
		K(2)	E(4)			D(2)	
		E(4)	K(1)				
I104X (A*11)	12	L(6)	L(3)	15	I(9)	I(6)	
			M(1)			L(2)	
			V(1)			M(1)	
			I(1)			M(2)	
		M(4)	M(3)		M(2)	I(1)	
		I(1)	I(1)			M(1)	
		V(1)	M(1)		L(1)	I(1)	
		V(1)	I(1)				

Part	Position (Restriction HLA)	HLA:		HLA:		HLA:	
		Couple Num.	+ Index	- Contact	Couple Num.	- Index	+ Contact
p24	A196X (B*38)	6	A(6)	A(6)	8	G(4) A(4)	G(2) A(2) A(4)
	V215X (B*40)	14	V(7) A(3) T(3) L(1)	V(5) I(1) L(1) A(2) I(1) V(3) L(1)	7	V(6) T(1)	L(2) V(2) I(1) T(1) T(1)
	M228X (B*13)	10	M(7) L(2) I(1)	M(7) L(2) M(1)	11	M(10) I(1)	M(7) L(3) I(1)
	T242X (A*33)	14	N(7)	T(4) N(2) S(1)	9	T(9)	N(6) T(3)
	T242X (B*46)	12	T(12)	T(8) N(4)	11	T(11)	T(11)
	T242X (B*58)	7	N(6) T(1)	T(4) N(2) S(1) T(1)	5	T(5)	N(5)
	G248X (A*33)	7	G(3) A(3) T(1)	G(3) A(1) T(1) G(1) A(1)	9	G(9)	G(8) A(1)
	G248X (B*58)	7	G(3) A(3) T(1)	G(3) A(1) T(1) G(1) A(1)	5	G(5)	G(4) A(1)
	P255X (A*11)	12	P(7) A(4) S(1)	P(7) P(4) P(1)	15	P(15)	P(14) A(1)
	V280X (B*46)	12	V(7) T(3) I(1) S(1)	V(7) T(2) V(1) V(1) V(1)	10	V(9) I(1)	V(6) I(2) T(1) V(1)
	S281X (B*52)	7	G(6) S(1)	G(4) S(2) S(1)	8	S(7) G(1)	S(4) G(3) S(1)
	R286X (B*52)	7	K(5) R(2)	K(3) R(2) R(2)	8	R(6) K(2)	R(6) K(2)
	T310X (A*33)	14	S(7) T(7)	S(4) T(3) T(7)	9	T(6) S(3)	T(6) S(3)
	T310X (B*58)	7	T(4) S(3)	T(4) S(2) T(1)	5	T(3) S(2)	T(3) S(2)
	N315X (A*33)	14	N(10) H(3) T(1)	N(10) N(3) T(1)	9	N(8) H(1)	N(8) H(1)

Part	Position (Restriction HLA)	HLA:		HLA:			
		Couple Num.	+ Index	- Contact	Couple Num.	+ Index	- Contact
p7	V323X (B*46)	12	V(10)	V(10)	10	V(7)	V(6)
			I(2)	V(2)		I(2)	I(1)
						A(1)	V(1)
p6	T427X (B*40)	14	T(13) S(1)	T(13) T(1)	7	T(7)	T(4) N(3)
	I437X (B*15)	13	I(12) F(1)	I(12) L(1)	19	I(15)	I(12) L(2) F(1) L(4)
	L483X (B*40)	14	H(8) R(2) P(2) Q(1) Y(1)	H(6) Q(1) Y(1) H(2) P(2) Q(1) H(1)	7	H(6)	H(2) P(2) Q(2)
	P485X (B*40)	14	P(10) *(4)	P(10) *(3) P(1)	7	P(7)	P(4) *(3)
	L486X (B*38)	8	L(8)	L(6) S(2)	6	L(5) S(1)	L(4) A(1) L(1)
	V487X (B*58)	7	V(4) I(2) T(1)	V(3) T(1) I(2) V(1)	5	V(5)	I(3) V(2)

7. HIV-1 感染病態に関わる宿主因子の解析

分担研究者 塩田 達雄 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 HIV 感染症に関わるウイルス側ならびに宿主側因子について検討し、以下の知見を得た。

1) HIV-2 のカプシドタンパク質の 120 番目のアミノ酸残基は、ウイルスのカニクイサル TRIM5 α に対する感受性を決定しており、プロリンなら感受性、アラニンあるいはグルタミンなら耐性を示す。HIV-2 カプシドの 120 番目のアミノ酸のヒト TRIM5 α に対する感受性を検討したところ、カニクイサル TRIM5 α に感受性のものはヒト TRIM5 α にも感受性、カニクイサル TRIM5 α に耐性のものはヒト TRIM5 α にも耐性を示し、HIV-2 の TRIM5 α 感受性はヒトとカニクイサルとで共通であることが明らかになった。西アフリカの HIV-2 感染者コホートでカプシドの 120 番目のアミノ酸と血中ウイルス量との関係を検討したところ、ヒト TRIM5 α に耐性の HIV-2 を持つ感染者は感受性の HIV-2 を持つ感染者に比べて血中ウイルス量が有意に低下していた。

2) ヒト TRIM5 α の RING ドメインのアミノ酸置換を伴う一塩基多型 43Y は TRIM5 α の HIV-1 感染阻害効果を完全に失わせるとの報告が米国のグループよりなされた。しかし、我々が日本人ならびにフランス人 HIV-1 感染者においてこの多型を解析したところ、この多型は HIV-1 感染症の病態進行に影響しないことが明らかになった。さらに遺伝子工学的に発現させた場合でも、この多型の有無により TRIM5 α の HIV-1 感染阻害効果には大きな違いが見られなかった。従って上記の報告の信憑性には疑いがあることが明らかになった。

A. 研究目的

HIV 感染症の病態進行は感染者ごとに大きく異なる。また、HIV 感染感受性自体にも個人差が存在する。本研究は病態進行や HIV 感染感受性の違いを決定する宿主側の因子を明らかにすることを目的とする。このような因子が明らかにできれば、各 HIV 感染者の予後予測に役立つだけでなく、その因子を標的とした新しい HIV 制御の戦略を提示できると考えている。本年度は以下の二つを具体的な研究目的とした。

1) HIV-2 のカプシドタンパク質の 120 番目のアミノ酸残基は、ウイルスのカニクイサル TRIM5 α に対する感受性を決定しており、プロリンなら感受性、アラニンあるいはグルタミンなら耐性を示す。今年度は、HIV-2 カプシドの 120 番目のアミノ酸のヒト TRIM5 α に対する感受性を明らかにすることを目的とした。

2) TRIM5 α の RING ドメイン中のアミノ酸置

換を伴う一塩基多型 43Y が日本ならびにフランスにおいて実際に HIV-1 感染症の病態進行に影響するか否か、また TRIM5 α の抗 HIV-1 効果に影響するか否か、を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) HIV-2 株として UC1、UC2、UC7、UC12、UC14、9421、12741、GH123 の 8 株を用いた。このうち UC12 と GH123 がカニクイサル TRIM5 α に感受性、残りの 6 株が耐性を示す。ヒト CD4 陽性 T 細胞株 Hut78 にヒト TRIM5 α を発現するセンダイウイルスを感染させ、これらの HIV-2 株のヒト TRIM5 α 感受性を検討した。HIV-2 感染者コホートは Oxford 大学の Sarah-Rowland Jones 教授らとの共同研究で行った。

2) 病態進行の緩慢な日本人 HIV-1 感染者 21 名 (1985 年までに感染した血友病の感染者で

2001年まで未治療でCD4陽性細胞数が200個/ μ l以上)、病態進行の標準的な日本人HIV-1感染者28名(1996年までにエイズを発症した15名と1999年までにエイズで死亡した13名)、病態進行の緩慢なフランス人HIV-1感染者45名(ALTコホート)および標準的な病態進行を示すフランス人HIV-1感染者62名(IMMUNOCOコホート)の末梢血単核細胞から常法に従いゲノムDNAを抽出し、PCRにより、TRIM5 α のRINGドメインとB-box-2ドメインに対応する542塩基の領域を増幅し、ABI DNA シークエンサーを用いてその領域の全塩基配列を決定した。

多型を持つTRIM5 α の機能解析は、ヒトTRIM5 α の微弱な抗HIV-1活性を増幅して信頼性の高い結果を得るため、ヒトTRIM5 α のRING、B-box-2ならびにcoiled-coil領域とアフリカミドリザルTRIM5 α のSPRY領域を組み合わせたキメラTRIM5 α を作成し、43Yの多型を持たないキメラTRIM5 α と多型を持つキメラTRIM5 α を恒常的に発現するヒトC143細胞株をそれぞれ作成し、それらにGFPを感染マーカーとするHIV-1ベクターを感染させてGFP陽性細胞数を数えることにより行った。

(倫理面への配慮)

HIV-1感染者ならびに非感染者の検体を使用するにあたって、検体の提供者には遺伝子解析を行うことを含めて十分に説明を行い、書面による同意を得られた場合のみを解析の対象とし、検体は匿名化して個人情報が特定できないようにして扱った。

C. 研究結果

1) HIV-2株としてUC1、UC2、UC7、UC12、UC14、9421、12741、GH123の8株のヒトTRIM5 α に対する感受性を検討したところ、カニクイサルTRIM5 α に感受性のUC12とGH123は感受性、カニクイサルTRIM5 α に耐性の残り6株は耐性を示した。

西アフリカのギニアビサウのHIV-2感染者コホートの69名の感染者の血中のHIV-2のカプシドタンパク質遺伝子の塩基配列を検討したところ、120番目のアミノ酸がプロリンでヒトTRIM5 α に感受性と考えられるHIV-2に感染した感染者の血中のHIV-2量は、120番目のア

ミノ酸がアラニンもしくはグルタミンでヒトTRIM5 α に耐性と考えられるHIV-2に感染した感染者のHIV-2量よりも有意に低下していた(P=0.02)。

2) ヒトTRIM5 α の一塩基多型43Yは、TRIM5 α の活性中心の一つRINGドメインの始めから29番目のヒスチジンがチロシンに置換する多型である。病態進行の緩慢な日本人HIV-1感染者21名のうち、この多型のホモ接合は1名、ヘテロ接合は5名、野生型は15名で、多型の頻度は0.167であった。一方、病態進行の速やかな日本人HIV-1感染者28名のうちホモ接合は1名、ヘテロ接合は5名、野生型は22名であり、多型の頻度は0.125であり、両群間で多型の頻度に統計学的に有意な差は認められなかった(P=0.77)。また、病態進行の緩慢なフランス人HIV-1感染者45名(ALTコホート)においては多型の頻度は0.29、標準的な病態進行を示すフランス人HIV-1感染者62名(IMMUNOCOコホート)においては0.23であり、病態進行の緩慢な感染者と標準的な感染者の間でこの多型の頻度にやはり差がないことが明らかになった(P=0.46)。

ヒトTRIM5 α の微弱な抗HIV-1活性を増幅して信頼性の高い結果を得るため、ヒトTRIM5 α のRING、B-box-2ならびにcoiled-coil領域とアフリカミドリザルTRIM5 α のSPRY領域を組み合わせたキメラTRIM5 α を作成し、43Yの多型を持たないキメラTRIM5 α と多型を持つキメラTRIM5 α との間で抗HIV-1効果を比較した。その結果、43Yの多型を持つキメラTRIM5 α は、多型を持たないキメラTRIM5 α とほぼ同様のHIV-1感染阻害効果を示すことが明らかになった。

D. 考察

1) 本研究により、カニクイサルTRIM5 α に感受性のHIV-2株はヒトのTRIM5 α にも感受性、カニクイサルTRIM5 α に耐性のHIV-2株はヒトのTRIM5 α にも耐性を示すこと、HIV-2の株間によるヒトTRIM5 α に対する感受性の違いは、HIV-2感染者の病態進行速度の違いを決定していることが明らかになった。HIV-2感染者の血中HIV-2量との間に相関のあったカプシドのアミノ酸は120番目以外に二カ所あり、現在、

この2カ所のアミノ酸置換が HIV-2 の TRIM5 α 感受性に及ぼす影響を検討している。

2) ヒト TRIM5 α の一塩基多型 43Y は、TRIM5 α の活性中心の一つ RING ドメインの始めから 29 番目のヒスチジンがチロシンに置換する多型で、米国の Sawyer らは、この多型により TRIM5 α の抗 HIV-1 阻害効果が完全に失われると報告した (Current Biology 15, 95-100, 2006)。しかし、我々の研究結果では、日本人ならびにフランス人 HIV-1 感染者のいずれにおいても、この多型が HIV-1 感染症の病態進行に影響している可能性を示唆する証拠は得られなかった。また、遺伝子工学的に発現させた場合でも、多型の有無は TRIM5 α の HIV-1 感染阻害効果に影響するという Sawyer らの結果を再現することができなかった。

現在のところ、我々が Sawyer らの結果を再現できない理由は明らかではないが、非常に微弱なヒト TRIM5 α の抗 HIV-1 活性への多型の影響を、そのまま検討した彼等の実験系に無理があったのかも知れない。

E. 結論

1) カニクイサル TRIM5 α に感受性の HIV-2 株はヒトの TRIM5 α にも感受性、カニクイサル TRIM5 α に耐性の HIV-2 株はヒトの TRIM5 α にも耐性を示すこと、HIV-2 の株間によるヒト TRIM5 α に対する感受性の違いは、HIV-2 感染者の病態進行速度の違いに影響することが明らかになった。

2) 日本人ならびにフランス人 HIV-1 感染者において、TRIM5 α の RING ドメインの一塩基多型 43Y は、HIV-1 感染症の病態進行に影響しないことが明らかになった。また、この多型の有無により TRIM5 α の HIV-1 感染阻害効果には違いが見られなかった。従って Sawyer らの報告の信憑性には疑いがあることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Song H, Nakayama EE, Likanonsakul S, Wasi C, Iwamoto A, Shioda T. A three-base-deletion polymorphism in the upstream non-coding region of human interleukin 7 (IL-7) gene could enhance levels of IL-7 expression. International Journal of Immunogenetics. 2007;34:107-13.
- 2) Wichukchinda N, Kitamura Y, Rojanawiwat A, Nakayama EE, Song H, Pathipvanich P, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Iwamoto A, Shioda T, Ariyoshi K. The polymorphisms in DC-SIGN affect susceptibility to HIV type 1 infection. AIDS. Res. Hum. Retrovir. 2007;23:686-92.
- 3) Lwembe R, Ochieng W, Panikulam A, Mongoina CO, Palakudy T, Koizumi Y, Kageyama S, Yamamoto N, Shioda T, Musoke R, Owens M, Songok EM, Okoth FA, Ichimura H. Anti-retroviral drug resistance-associated mutations among non-subtype B HIV-1-infected Kenyan children with treatment failure. J Med Virol. 2007;79:865-72.
- 4) Ohishi M, Shioda T, Sakuragi J. Retro-transduction by virus pseudotyped with glycoprotein of vesicular stomatitis virus. Virology. 2007;362:131-8.
- 5) Koizumi Y, Kageyama S, Fujiyama Y, Miyashita M, Lwembe R, Ogino K, Shioda T, Ichimura H. RANTES -28G delays and DC-SIGN - 139C enhances AIDS progression in HIV type 1-infected Japanese hemophiliacs. AIDS Res Hum Retroviruses. 2007;23:713-9.
- 6) Nakayama EE, Carpentier W, Costagliola D, Shioda T, Iwamoto A, Debre P, Yoshimura K, Autran B, Matsushita S, Theodorou I. Wild type and H43Y variant of human TRIM5 α show similar anti-human immunodeficiency virus type 1 activity both in vivo and in vitro. Immunogenetics. 2007 ;59:511-5.
- 7) Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human

- TRIM5alphas. *J Virol.* 2007;81:7280-5.
- 8) Sakuragi J, Sakuragi S, Shioda T. Minimal region sufficient for genome dimerization in the human immunodeficiency virus type 1 virion and its potential roles in the early stages of viral replication. *J Virol.* 2007;81:7985-92.
 - 9) Koh Y, Matsumi S, Das D, Amano M, Davis DA, Li J, Leschenko S, Baldrige A, Shioda T, Yarchoan R, Ghosh AK, Mitsuya H. Potent inhibition of HIV-1 replication by novel non-peptidyl small molecule inhibitors of protease dimerization. *J Biol Chem.* 2007;282:28709-20.
 - 10) Liu H, Nakayama EE, Theodorou I, Nagai Y, Likanonsakul S, Wasi C, Debre P, Iwamoto A, Shioda T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *Int J Immunogenet.* 2007;34:325-335.
 - 11) Louisirirothanakul S, Sutthent R, Wasi C, Chuenchitra T, Nitayaphan S, Brown AE, Polonis VR, Nakayama EE, Shioda T, Liu H, Takebe Y. Host Genetic Analysis of HIV-1 Subtype CRF01_AE(E)-Infected Thai Patients with Different Rates of Disease Progression. *AIDS Research and Human Retroviruses.* 2007;23:1605-1607
 - 12) Sugimoto C, Nakayama EE, Shioda T, Villinger F, Ansari AA, Yamamoto N, Suzuki Y, Nagai Y, Mori K. Impact of Glycosylation on Antigenicity of Simian Immunodeficiency Virus SIV239: Induction of Rapid V1/V2 Specific Non-neutralizing Antibody and Delayed Neutralizing Antibody Following Infection with an Attenuated Deglycosylated SIV239 Mutant. *Journal of General Virology.* 2008;89(Pt 2):554-66.
 - 13) Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells. *Journal of Medical Virology.* in press
 - 14) Wichukchinda N, Nakayama EE, Rojanawiwat A, Pathipvanich P, Auwanit W, Vongsheree S, Ariyoshi K, Sawanpanyalert P, Shioda T. Effects of CCR2 and CCR5 Polymorphisms on HIV-1 Infection in Thai Females. *J Acquir Immune Defic Syndr.* in press
 - 15) Ken Kono, Haihan Song, Yasuhiro Shingai, Tatsuo Shioda and Emi E. Nakayama. Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5 α s against HIV-2 infection. *Virology.* in press
 - 16) Jun-ichi Sakuragi, Sayuri Sakuragi, Masahisa Ohishi, and Tatsuo Shioda. A rapid recombination assay of HIV-1 using murine CD52 as a novel biomarker. *Microbes and Infection.* in press
2. 学会発表
 - 1) Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5alphas. Conference for Retrovirus and Opportunistic Infection 2008, Boston, USA.
 - 2) 中山英美、塩田達雄。サイクロフィリンAのHIV-1感染阻害効果。第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌。
 - 3) 櫻木淳一・櫻木小百合・塩田達雄 HIV-1ゲノム組換え標的の必要条件 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌。
 - 4) 大石真久・櫻木淳一・塩田達雄 HIV-1のゲノム二量体化とウイルス粒子成熟との相関に関する研究 第55回日本ウイルス学会学術集会、札幌。
 - 5) 櫻木淳一・塩田達雄 HIV-1ゲノム組換え標的の必要条件に関する解析 第21回日本エイズ学会学術集会、広島。
 - H. 知的所有権の出願・登録状況
 1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし

8. HIV-1 感染に伴うゲノム DNA 二重鎖切断の分子機構と潜伏感染細胞からのウイルス再産生における自然免疫シグナル伝達の関与

分担研究者 石坂 幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 部長

研究要旨 エイズの臨床では、潜伏感染病態を克服できない点が大きな問題となっている。本研究では潜伏感染状態で重要な役割を示すマクロファージに着目し、その初期感染機構及び潜伏感染状態からのウイルス再産生機序を解析した。その結果、HIV-1 感染に伴って誘導されるゲノム DNA 二重鎖切断が、ゲノムへの挿入ステップで重要な役割を示すことが明らかとなった。また、潜伏感染状態からの再活性化には IL-6 が関与すること、さらに HIV-1 に由来する遺伝子産物 Vpr がマクロファージの自然免疫シグナル受容体を介して IL-6 産生を誘導することが分かった。本研究によりマクロファージを巡る感染病態が明確となり、新たな抗エイズ療法の糸口が得られるものと期待される。

A. 研究目的

Antiretroviral therapy が導入され、HIV-1 陽性症例の予後が劇的に改善された。しかし近年の研究からウイルスを体内から駆逐することは困難であることが分かり、潜伏感染状態で重要な役割を担う単球/マクロファージ (Mφ) 系細胞へのウイルス感染機序と潜伏感染細胞の再活性化機序を理解することが重要な課題となっている。

近年、ウイルス感染の際にゲノム DNA 二重鎖切断 (DSB: DNA double strand breaks) が誘導されること、また DSB によって惹起される細胞側のシグナルを遮断することで、ウイルス感染が阻害されることが報告された。分担研究者はウイルス感染の際に DSB が惹起されることを見出すとともに、アクセサリ遺伝子産物 Vpr が DSB を強く誘導することを早期から見出し、報告してきた。

Vpr はマクロファージへのウイルス感染の際に重要な役割を担っていることが報告されているが、その機序は明確になっていない。非分裂細胞であるマクロファージは増殖細胞と異なり、DNA 複製の過程で自然に生じる DSB の形成が無い。そこで一つの可能性として、DSB サイトがウイルス感染の場として機能し、ウイルス感染効率の上昇に寄与している事が考えられる。この可能性を明らかにすることが

本研究の第一目標である。

一方、平成 18 年度の研究成果として、HIV-1 感染患者血液中に nM オーダーの Vpr が存在することを報告した。そして、同程度の濃度のリコンビナント Vpr 蛋白質(以下 rVpr)を潜伏感染細胞である U1 細胞に添加するとヒト末梢血単核球細胞(以下 PBMC)依存的にウイルス再産生が誘導されることが分かった。そしてさらに、この現象が Mφ からの IL-6 産生を介して誘導されることも見いだした。本課題では、この知見を背景に IL-6 の産生機序を分子レベルで明らかにすることを第二の目標とした。

B. 研究方法

1) DSB によるウイルス感染効率の上昇

DSB の感染における役割を明らかにするため、ウイルス感染と並行して、2.5 Gy の X 線照射を行った。感染 2 日後の Mφ から DNA を抽出し、Alu-PCR 法により解析した。また、DSB により惹起される細胞内シグナルの関与を明らかにする目的で、DNA 損傷シグナルの最も上流で機能する遺伝子産物である ATM(Ataxia telangiectasia mutated)に対する阻害剤 (KU55933) を添加し、X-線照射後の挿入効率への影響を調べた。

2) DSB サイトが持つウイルス DNA のゲノム

挿入過程における役割

DSB サイトのウイルス挿入における役割を調べるため、酵母由来 18 塩基を認識する制限酵素サイトと制限酵素を組合せたウイルス感染システムを構築した。使用した制限酵素サイトは SclI で、ヒトゲノム中には存在しないことが知られている。まず、ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 に SclI サイトを含むプラスミド DNA を導入し、ゲノムに組み込まれた細胞株(THP-1/SclI)を得た。フォルボールエステルである PMA を処理する事で THP-1/SclI を静止 Mφ 様細胞にした後、アデノウイルスを用いて SclI を強制的に発現させるのと並行して、HIV-1 ウイルスを感染させた。感染後の細胞由来 DNA について Nested-qPCR を行い、SclI サイト近傍に組み込まれたウイルス DNA のコピー数を半定量した。DNA コピー数の検定は Taqman probe とリアルタイム PCR (ABI 社製) を使用して行った。

3) rVpr による IL-6 産生機序の解明

rVpr はグルタチン S トランスフェラーゼ (GST) 融合蛋白質としてバクテリアで発現させた後、グルタチンビーズを用いて精製した。Triton X-100 入りのバッファーで洗浄した後、プロテアーゼを作用させ、rVpr 単体を回収した。その後、Vpr に対する単クローン抗体(クローン 8D1)を用いてアフィニティー精製を行った。カラムに吸着させた後、医療用蒸留水を用いて作成したバッファーで十分に洗浄することで大腸菌由来エンドトキシンを排除した。pH2.5 の溶出バッファーを用いて rVpr を抗体カラムから溶出し、速やかに pH8.5 のバッファーで中和した。精製 rVpr の濃度は自身が作成した ELISA キットで測定した。PBMC はリンフォブレップで調整後、単球細胞として CD14 を指標に MACS ビーズ (Milteni 社製) で調整した。rVpr によって誘導される IL-6 mRNA 量は定量的 PCR 法により行った。コントロールとして β -actin mRNA を用いた。siRNA は Lipofectamine 2000 を用いて導入し、内在性遺伝子産物発現の低下をウエスタン解析で検定した後、IL-6 発現誘導実験に供した。

C. 研究結果

1) DSB によるウイルス感染効率の上昇

X-線照射を施すことで、ウイルス DNA のゲノムへの挿入頻度は 30 倍以上増加した。また、ATM 阻害剤をこの中に添加すると、その上昇が完全に抑制された。

2) DSB サイトが持つウイルス DNA のゲノム挿入過程における役割

HIV-1 を感染させる際に SclI を作用させることにより、ゲノム中の SclI サイト近傍へのウイルス DNA の頻度が上昇した。コントロールとして使用した LacZ 発現ウイルス感染群と比較して、有意に挿入頻度の違いが検出された。組み込まれた DNA をクローニングし、塩基配列を決定したところ、SclI サイト内にウイルス DNA が挿入されていることが分かった。

3) rVpr による IL-6 産生機序の解明

rVpr による IL-6 産生には MAP キナーゼや IKK の関与が示唆された。さらに、自然免疫受容体 (Toll-like 受容体) の下流で機能するアダプター分子、MyD88 を siRNA を用いてノックダウンすると、rVpr により誘導される IL-6 mRNA の産生は顕著に阻害された。

D. 考察

1) DNA 損傷とウイルス感染

DNA 損傷シグナルとウイルス感染の関連性については一定の見解が得られていないのが現状である。即ち、DSB シグナルがウイルス感染に重要であるとする報告(Nat. Cell Biol.7, 493, 2005; PNAS 100, 4778, 2003) と、必要でないとする報告 (J. Virol. 79, 1389, 2005; J. Virol. 79, 2973, 2005) に 2 分されている。今回、静止 Mφ を使用したモデル実験により、DSB サイトにウイルス DNA が挿入される可能性が示唆された。また、健常人由来 Mφ に X-線照射を施すことによってウイルス DNA の挿入頻度が顕著に増加したことから、DNA 損傷は少なくとも Mφ においては重要であること、また DSB サイトはウイルス DNA がゲノムへ組み込まれる際のプラットフォームとして機能している可能性が示唆された。その際に機能する宿主側因子の同定に向けた解析を今後継続する予定である。DSB サイトへの外来性遺伝子の挿入

については、アデノ随伴ウイルスや肝炎ウイルス DNA(Nat. Genet. 36, 767, 2004: PNAS 101, 11135, 2004)を用いた解析が行われている。即ち、種々のウイルスはその種類に関係なく、DSB で惹起される宿主細胞の細胞内シグナルを上手く利用することで、効率良くゲノムに組み込まれる術を心得ていることが示唆される。

一方今年度、潜伏感染細胞からのウイルスの再産生機序に関する新しい知見が得られた。即ち、MyD88 をノックダウンすることで rVpr による IL-6 産生が著明に阻害されたことから、Vpr が自然免疫に関与する Toll-like 受容体を標的としている可能性が強く示唆された。これまで Vpr に関する膨大な解析が行われているが、その受容体に関する報告は全く無い。逆に Vpr の機能には、細胞側受容体は必要としないとする報告もある。今年度の解析により Vpr の受容体の存在が強く示唆されたことから、次年度にかけて受容体の同定を試みる。

E. 結論

ウイルス DNA の染色体へのインテグレーションの過程に DSB と DSB 誘発細胞内シグナルの関与が示唆された。一方、潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導に関する IL-6 産生は自然免疫シグナルに関与する受容体が重要な役割を担っていることが強く示唆された。次年度中に Vpr が結合する受容体の同定を目指す。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitayama H., Miura Y., Ando Y., Hoshino S., Ishizaka Y., and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus Type-1 Vpr Inhibits Axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction. *J. Virol.* 82, 2528-2542, 2008.
- 2) Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, Sata T, Tokunaga K All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 35, 2955-2964, 2007.
- 3) Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura, M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S. and Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 23, 391-397, 2007.
- 4) Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, K., Takizawa, Y., Tokunaga, K., Taguchi, T., Hoshino, S., Miyagawa, K., Sata, T., Kurumizaka, H., Yuo, A. and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26, 477-486, 2007.

2. 学会発表

- 1) Sun B, Hoshino S, Nakai-Murakami C and Ishizaka Y. Mechanism and biological relevance of DNA double-strand breaks by HIV-1. 第8回熊本エイズセミナー、熊本 (2007)
- 2) Hoshino S, Nakai-Murakami C, Shimura M and Ishizaka Y. Genomic instability by VPR: Implications as a possible cause of non-AIDS defining cancers. HIV/AIDS Research at the National Cancer Institute. A record of sustained excellence. Bethesda USA, November (2007)
- 3) 孫賓蓮、星野重樹、中井智嘉子、佐多徹太郎、徳永研三、石坂幸人 Vpr によるゲノム DNA 二重鎖切断はマクロファージへの HIV-1 感染効率を上昇させる。第 55 回日本ウイルス学会、札幌、10 月 (2007)
- 4) 孫賓蓮、星野重樹、中井智嘉子、佐多徹太郎、徳永研三、石坂幸人.マクロファージへの HIV-1 感染におけるゲノム DNA 二重鎖切断の役割及び機序. 第 21 回日本エイズ学会、広島、11 月 (2007)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号 特 2007-57387

発明人：石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡
発明の名称：「新規核移行ペプチド」

出願人：国立国際医セ、名糖産業株式会社

出願日 ; 2007/3/7

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

9. ヒト宿主因子 APOBEC3G の HIV-1 感染病態制御と HIV-1 Vif による回避機構の解明

分担研究者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官

研究協力者 岩部 幸枝 (国立感染症研究所感染病理部エイズ予防財団 RR)

研究要旨 ヒト抗レトロウイルス宿主蛋白 APOBEC3G を含む APOBEC3 ファミリー蛋白は、霊長類において A から H まで 7 種類あるが、これらの本質的な役割を検討する為に、レトロトランスポゾン LINE-1 に対する抑制機能の有無を調べた。その結果全ての APOBEC3 ファミリー蛋白が抗 LINE-1 レトロ転移活性を有していたことから、霊長類の進化において新たなレトロウイルスの出現に伴い分化してきたと考えられる APOBEC3 ファミリーは、prototypic な活性を今もなお維持しており、その活性は抗 HIV 活性の一部としても機能している可能性が示唆された。

APOBEC3G の活性を相殺する HIV-1Vif は、サブタイプにより遺伝子多様性があることから、昨年、我々はその生物学的活性の違いを検討した結果、Vif の抗 APOBEC3G 活性はサブタイプ依存的であった。本年度、他のサブタイプ由来 Vif より高い抗 APOBEC3G 活性を示す C Vif の高活性規定領域を Mutational analysis によって検討した結果、N 末の 2 アミノ酸が同定され、そのうちの一つは APOBEC3G との直接結合に関わることが示唆されている領域であることが明らかになった。

A. 研究目的

本年度は、まずヒトが自然免疫として備えている抗レトロウイルス宿主因子 APOBEC3G の本質的な役割は何かについて考察した。APOBEC3G を含む APOBEC3 ファミリー蛋白は、脊椎動物において、魚から鳥にかけては存在せず、哺乳類で出現して、マウスで一つ、牛・豚で二つ、犬・馬で三つ存在するといわれる。霊長類は A、B、C、DE、F、G、及び H の七種類を有している（ヒトの場合は第 22 番染色体にその 7 遺伝子がタンデムに存在する）が、これは霊長類 3300 万年の歴史における、レトロウイルスとの攻防の中で獲得してきたものではないかと考えられている。HIV-1 の様なモダン・レトロウイルスの原型と考えられているレトロトランスポゾンの中に non-LTR 型である LINE-1 があるが、これはヒトゲノムの 17% を占め、更にその中には全長を有する活性化型が 100 コピーあると言われる。活性化型 LINE-1

は血友病や筋ジストロフィ他の遺伝病の原因である一方で、結腸癌も引き起こすことから、LINE-1 のレトロ転移は、生殖細胞のみならず、体細胞でも起こり得ることが示唆されている。従って正常細胞においては、恒常的にこの LINE-1 レトロ転移を抑制する機構が存在する筈で、我々はそれを担うのが APOBEC3G を含む APOBEC3 ファミリー蛋白ではないかと考えた。本年度、我々は、LINE-1 のレトロ転移に対する APOBEC3 ファミリー蛋白の抑制活性の有無を分子レベルで検証した。

その強力な抗レトロウイルス蛋白 APOBEC3G に対抗する HIV-1 のウイルス蛋白は Virion infectivity factor (Vif) であり、APOBEC3G をプロテオソーム分解あるいは翻訳阻害することにより、逆転写中のウイルスゲノムを守る機能を持っている。現在までの世界レベルでの Vif/APOBEC3G 研究は、殆ど全てがサブタイプ B 由来 Vif 及び細胞株由来

みを用いて行われてきた。この点を重視して昨年度は、遺伝子レベルで多様性の高いサブタイプ別臨床分離株由来 Vif が、異なる抗 APOBEC3G 活性を示すか否を解析した。その結果、活性の強度は C > (A/G) > B > A > A/E の順に認められ、抗 APOBEC3G 活性がサブタイプ依存的であることを報告した。が、我々の実験系で認められた極めて低い A/E Vif の活性は、*in vivo* において Vif の抗 APOBEC3G 活性が不可欠であることを鑑みると、矛盾していると思われた。

そこで本年度、全てのサブタイプ別 Vif の抗 APOBEC3G 活性を異なる実験系によって再検証するとともに、活性の強弱に関わる責任領域を同定することを目的とした。

B. 研究方法

i) APOBEC3 ファミリーの cDNA クローニング

ヒト CD4 陽性 T リンパ球細胞株 H9 及びヒト子宮頸癌細胞 HeLa より、RNAqueous Kit (アンピオン社) を用いてトータル RNA を単離した。Titan One Tube RT-PCR Kit (ロシュ社) を用いて、H9 RNA を鋳型に APOBEC3DE、3F、及び 3H 遺伝子の、また HeLa RNA を鋳型に APOBEC3A、3B、及び 3C 遺伝子の、cDNA 合成及び PCR 増幅を行った。更にその PCR 産物を Expand High Fidelity DNA Polymerase (ロシュ社) によって再増幅した後、KpnI/XhoI で制限酵素処理を行い、あらかじめ 3 回反復へマグルチニン・タグを付加した pCAGGS に挿入した。作製した各 APOBEC3 ファミリー発現ベクターの遺伝子配列は ABI3130 シークエンサー (ABI 社) により確認した。APOBEC3G については昨年度にその発現ベクターを作製済みである。

ii) DNA トランスフェクション、ウエスタンブロットティング・アッセイ、間接蛍光抗体法

APOBEC3 ファミリー発現ベクターを各 250ng、空ベクター pCAGGS を 750 ng、FuGENE6 (ロシュ社) を用いて 3.5×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクションした。16 時間後、細胞を PBS で洗浄してフレッシュな培養液を加え、その 32 時間後に細胞を PBS で洗浄、細胞溶解液を 150 μ l 加えたものをウエスタンブロットティング用サンプルとした。等量の

2 x SDS サンプルバッファーを加えて、98°C で 5 分間ボイルしたものを 10 μ l、12.5% の SDS ポリアクリルアミドゲルにアプライして電気泳動を行った。泳動後のゲルをニトロセルロース膜に転写後、膜を抗 HA モノクローナル抗体 (シグマ社) で一次抗体処理、次にペルオキシダーゼ結合抗マウス抗体で二次抗体処理して、ECL (GE ヘルスケア社) により化学発光を行い、LAS3000 (富士フイルム社) で、APOBEC3 ファミリー蛋白をそれぞれ検出した。Restore Western Blot Stripping Buffer (ピアース社) で一次及び二次抗体を除去した後、抗 β -アクチン・モノクローナル抗体 (シグマ社)、更に抗マウス二次抗体で処理して、 β -アクチン蛋白を検出し、それを内部コントロールとした。細胞内局在性の検討のため、HeLa 細胞に同コンストラクトを、Lipofectamine Plus reagents (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。48 時間後に細胞を固定、抗 HA モノクローナル抗体で一次抗体処理、次に Alexa 488 結合抗マウス抗体 (Invitrogen) で二次抗体処理して、FV-1000 共焦点顕微鏡 (Olympus) により観察した。

iii) ウイルス感染性アッセイ

各 APOBEC3 ファミリー発現ベクターを 100 ng、水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクター pHIT/G を 100 ng、そして、ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として有するレンチ・トランスファー・ベクター pWPI-Luc を 500 ng、Gag-Pol 発現ベクター psPAX2 を 500 ng、空ベクター pCAGGS を 800 ng、あるいはルシフェラーゼをレポーター遺伝子として有するレトロ・トランスファーベクター pMSCVneo-Luc を 900 ng とレトロウイルスパッケージングベクター pVPack-GP (Stratagene) を 900 ng を、FuGENE6 を用いて 7×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクションした。16 時間後、細胞を PBS で洗浄してフレッシュな培養液を加え、その 32 時間後に余剰の DNA を除去する為に培養上清中に DNase 75 U/ml 及び MgCl₂ 10 mM を添加して、30 分インキュベート、培養上清を感染実験用に回収した。HIV-1 レポーターウイルスの培養上清を一部分注して、p24 ELISA Kit (レトロテック社) によりウイルスの定量を行った。レトロウイルス

(MuLV)の方は、上清回収後、200 μ l のライシスバッファー (プロメガ社) を加えて細胞を溶解、ルシフェラーゼ活性を Centro LB 960 (ベルトールド社) により測定することによりトランスフェクション効率を算出した。上清中の p24 量で、またはトランスフェクション効率で、ウイルス量を 1 ng p24 量のウイルスを均一化した後、 1.75×10^4 個/ウェルで 96 ウェルプレートに蒔いた 293T 細胞に感染させた。48 時間後に 200 μ l のライシスバッファー (プロメガ社) を加えて細胞を溶解した。そのうちの 20 μ l を用いて、ルシフェラーゼ活性を測定することにより、感染性を定量化した。

iv) LINE-1 レトロ転移アッセイ: 各 EGFP レポーター-LINE-1 発現ベクター、あるいは *neo^r* (ネオマイシン耐性遺伝子) レポーター-LINE-1 発現ベクターを 500 ng、APOBEC3 ファミリー発現ベクターを 100 ng、空ベクター-pCAGGS を 400 ng、FuGENE6 を用いて 3.5×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクション後、EGFP レポーターの系は 10 日間、*neo^r* レポーターの系は 0.5 μ g/ml のピューロマイシン存在下で 14 日間培養、レトロ転移の結果発現してきた EGFP は FACS により、ネオマイシン耐性で生き残った細胞は固定後にクリスタル・バイオレット (Merck) で染色しコロニーをカウントすることにより、それぞれ定量比較した。

v) 内在的な LINE-1 の mRNA 発現コピー数と LINE-1 コンストラクトによる *de novo* LINE-1 DNA コピー数の定量: RNAqueous Kit (アンピオン社) を用いて、2 人のドナー由来の末梢血リンパ球、293T、HeLa、HT1080、143BTK-細胞よりトータル RNA を単離、TURBO DNA-free (Ambion) により余剰の DNA を消化した。各 100 ng のトータル RNA と以下のプライマーとプローブ、QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen) を用いて ABI 7900HT (ABI) による Real-time RT-PCR で内在的 LINE-1 の mRNA 発現を検討した。センス; 5'-GAG AAC AAA GAC ACC ACA TAC C-3'/ アンチセンス; 5'-GGC ATT TAG TGC TAT AAA TTT CCC-3'、プローブ; 6-carboxyfluorescein (FAM)-5'-TCT CTG GGA CGC ATT CAA AGC

AGT-3'-black-hole quencher 1((BHQ1)。また用いた RNA 量が等量であることを GAPDH の mRNA 量で確認した。プライマーとプローブは以下の通り。センス; 5'-GAT GCT GGC GCT GAG TAC G-3'/ アンチセンス; 5'-GCA GAG ATG ATG ACC CTT TTG G-3'、プローブ; TETTM-5'-TGG AGT CCA CTG GCG TCT TCA CCA CC-3'-BHQ1。

また EGFP レポーター-LINE-1 発現ベクターのトランスフェクション後の *de novo* LINE-1 DNA コピー数を定量する為に、EGFP をターゲットとした Real-time PCR を行った。トランスフェクション後 14 日目に、EGFP アッセイを行った 293T 細胞から DNeasy kit (Qiagen) を用いて chromosomal 及び episomal DNA を抽出した。各 100 ng の抽出 DNA と以下のプライマーとプローブを用いて QuantiTect PCR (Qiagen) により行った。センス; 5'-GAA GAA CGG CAT CAA GGT GAA C-3'/ アンチセンス; 5'-GGT GCT CAG GTA GTG GTT GTC-3'、プローブ; FAM-5'-AGC GTG CAG CTC GCC GAC CA-3'-BHQ1。

vi) *de novo* LINE-1 DNA における deamination の検討: トランスフェクション後、2 日目と 6 日目に DNeasy kit を用いて 293T 細胞から DNA を抽出した。EGFP DNA を PfxUltima (Invitrogen) によって PCR 増幅、Zero Blunt PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いてクローニングし、ABI3130 によってシーケンス解析した。

vii) APOBEC3G に対する野生型 HIV-1 の感受性試験: HIV-1 の 3 種のサブタイプ B (NL4-3)・C (02ZM-DB33)、及び A/E (93TH51-13)の全長 cDNA クローンを 500 ng、空ベクター-pCAGGS を 400 ng、APOBEC3G 発現ベクターを 100 ng から 2 倍ずつ段階希釈したものを、293T 細胞にコトランスフェクションして得られたウイルスの p24 の定量を行った。1 ng p24 量のウイルスを、 $1. \times 10^4$ 個/ウェルで 96 ウェルプレートに蒔いた CD4 陽性 MAGIC5 細胞に感染させた。48 時間後に培養上清と等量の Beta-Glo 基質/ライシスバッファー (プロメガ社) を加えて細胞を溶解し、その細胞溶解液を用いて、Beta-Gal 活性から変換さ

れたルシフェラーゼ活性を Centro LB 960 (ペルトールド社) により測定することにより、感染性を定量化した。

viii) Vif 発現ベクターへの RRE の挿入及びサブタイプ間の組換え・点変異体の作製:

昨年作製したサブタイプ別 Vif 発現ベクターのマルチクローニングサイトに存在する *NotI* サイトに pNL4-3 より PCR 増幅した RRE フラグメント (nt. 7759-7992) を挿入した。最初に挿入した RRE のみ、ABI3130 によるシーケンス確認を行い、以後、同 RRE フラグメントを切り出して、他の全ての Vif 発現ベクターに挿入した。Orientation については、RRE のセンスプライマーと、マルチクローニングサイトに存在する T3 シーケンスをターゲットとしたアンチセンスプライマーにより確認した。

サブタイプ間の組換えは、保存されている Vif 遺伝子中央領域の *Pf1M1* site を利用してその前後を RRE を挿入した B (NL)・C (02ZM-DB33) 間で、またその上流の組換えは中間に位置する *NdeI* site で組換えを行った。また点変異体は、QuikChange mutagenesis (Stratagene) により作製した。それぞれの Vif 蛋白発現は、今回、複数のサブタイプ由来のカクテル・ペプチド免疫により作製したクロス・サブタイプ抗 Vif ウサギ血清 (MBL) を用いて確認した。

ix) HIV-1 サブタイプ別 Vif 蛋白機能テスト

ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として有するレンチ・トランスファー・ベクター pWPI-Luc を 500 ng、Gag-Pol 発現ベクター psPAX2 を

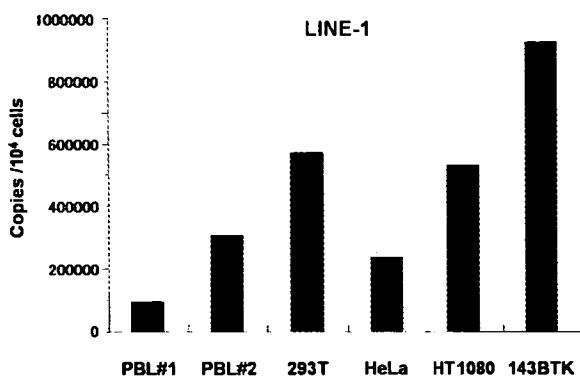


図 1. LINE-1 mRNA の内在的な発現レベル

500 ng、水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクター pHIT/G を 100 ng、pCA-hA3G-HA を 50 ng、各サブタイプ別 Vif 発現ベクターを 25ng、空ベクター pCAGGS を 825 ng、FuGENE6 (ロシュ社) を用いて 3.5×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクションした。以下は、研究方法 iii) と同様に行った

C. 研究結果

1. APOBEC3 ファミリー蛋白の LINE-1 レトロトランスポゾンに対する抑制効果

1) ヒト LINE-1 の内在的な発現レベルと APOBEC3 ファミリー蛋白の細胞内局在性

まず我々は、LINE-1 が培養細胞や初代細胞において内在的に発現しているか否かを、4 種類の培養細胞 (293T、HeLa、HT1080、及び 143BTK 細胞) と 2 人のドナー由来末梢血リンパ球から得られたトータル RNA を用いた real-time RT PCR により解析した。その結果、どの細胞においても一細胞あたり約 10~100 コピーの LINE-1 mRNA が発現していることが明らかになった (図 1)。次にヒト CD4 陽性株 T 細胞 H9 または HeLa 細胞から抽出した RNA より、7 種類の APOBEC3 蛋白の cDNA 作製を行い、それらを哺乳類細胞用発現ベクター pCAGGS (C 末 HA-tag 付) に挿入、ウエスタンブロッティング法により抗 HA 抗体を用いて各蛋白発現を確認した (図 2 左)。また細胞内局在性については抗 HA 抗体を用いた間接蛍光抗体法により行った。APOBEC3DE、3F、及び 3G 蛋白は細胞質局在、APOBEC3A、3C、及び 3H 蛋白は細胞質・核内の両局在、APOBEC3B は核局在が観察された。

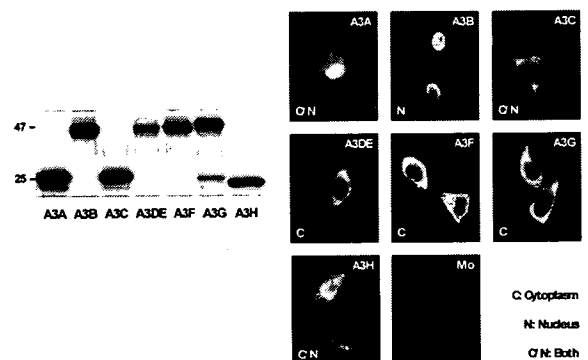


図 2. APOBEC3 ファミリーの細胞内局在性

2) APOBEC3ファミリー蛋白の抗レトロウイルス活性と抗 LINE-1 活性の検討

レトロウイルス (Vif 欠損 HIV-1 及び MuLV) に対する各 APOBEC3 蛋白の抑制活性を検討した。レンチベクター (HIV-1) またはレトロベクター (MuLV) と VSV-G 発現ベクター、及び APOBEC3 発現ベクターとのコトランスフェクションにより得られたウイルスを用いて 293T 細胞への感染を行い、ルシフェラーゼ活性の測定による感染性の比較を行った。HIV-1 においては、Vif を発現させない場合、近年報告にある通り、APOBEC3G は勿論、APOBEC3B、3F も強い抗ウイルス活性を、また APOBEC3C 及び 3DE は partial な活性を示した (図 3 上)。一方、MuLV に対しては APOBEC3B、3C、及び 3G が抗ウイルス活性を示し、これも過去の報告と一致していた (図 3 下)。

次に抗 LINE-1 活性を、EGFP-LINE-1 DNA を用いて検討した。このコンストラクトにおいては、全長の LINE-1 の下流に EGFP 遺伝子が逆向きに、更にその下流に CMV プロモーターが逆向きに挿入してあり、また EGFP そのものが γ -グロビンのイントロンで分断されている為、EGFP の発現は、転写・スプライシング・逆転写・インテグレーションが完結して初めて

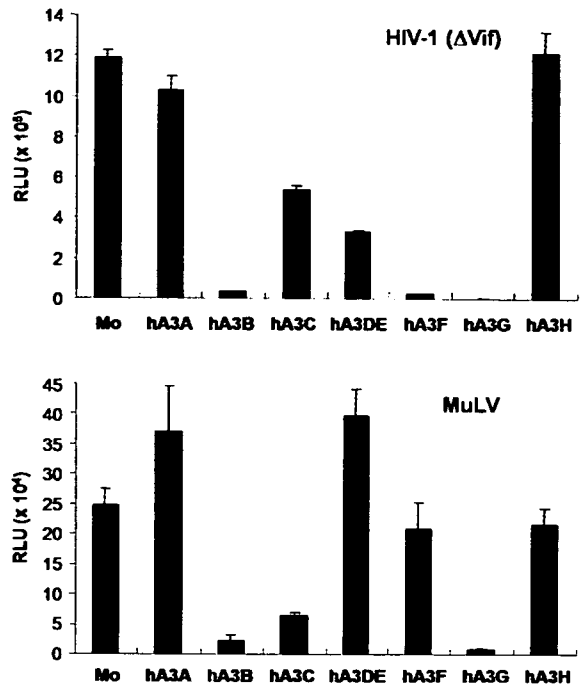


図 3. APOBEC3ファミリー蛋白の抗レトロウイルス活性

起こる (つまり EGFP 陽性細胞は即ち LINE-1 のレトロ転移が起きた細胞である) この LINE-1 コンストラクトと APOBEC3 発現ベクターの 293T 細胞へのコトランスフェクション 2 日後に、EGFP 陽性細胞を FACS で定量化した結果、APOBEC3A、3B、3F、及び 3G が特

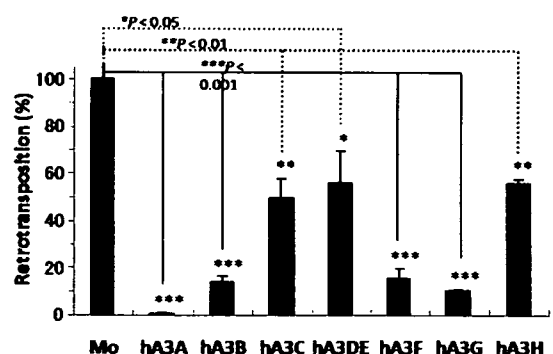
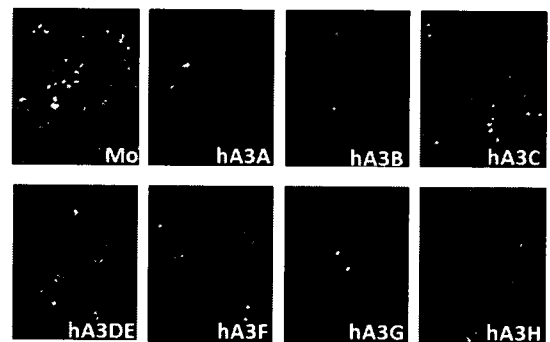
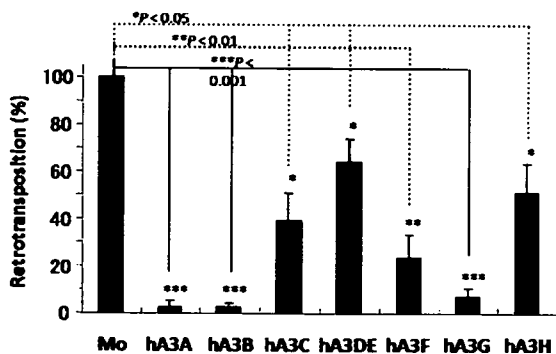
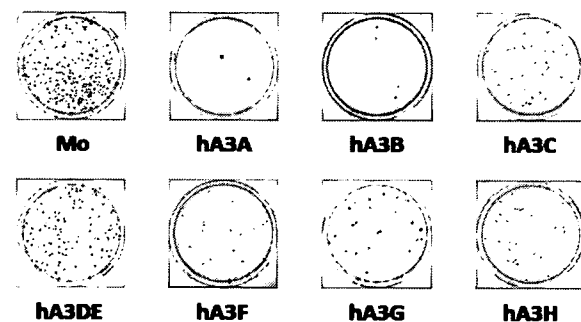


図 4. APOBEC3ファミリー蛋白の LINE-1 レトロ転移に対する抑制効果