

図 5. APOBEC3G による LINE-1 逆転写産物コピー数の減少

に強い抑制活性を示し、APOBEC3C、3DE、及び 3H も partial な活性を示した(図 4 左)。EGFP の代わりにネオマイシン耐性遺伝子を有するコンストラクトを HeLa 細胞へトランスフェクションし、G418 処理後の生き残り細胞のコロニーをカウントする実験系でも、上記の結果がほぼ完全に再現できた(図 4 右)。これらの結果より、我々は、全ての APOBEC3 ファミリー蛋白が、強弱の差はあれ、LINE-1 のレトロ転移を抑制する活性を有している、と結論付けた。

3) APOBEC3G による抗 LINE-1 機能解析

一方、先頃、ほぼ同時期に、欧米のグループから同様の報告が為されたが、我々の結果が彼らと明らかに異なる点がただ一つあった。それは我々の実験結果においては、強い抗レトロウイルス活性を有する APOBEC3G が、同時に強い抗 LINE-1 レトロ転移活性も示したということである。この結果を確認すべく、我々は次に、real-time PCR により、APOBEC3G を共発現した場合の LINE-1 の細胞内 DNA コピー数を測定した。LINE-1 のインプット DNA と区別する為に、スプライシング且つ逆転写(更にインテグレーション)した EGFP DNA のみを検出できるプライマーの設定により行った。その結果、図 5 に見られるように、図 4 の結果をほぼ再現できたことから、APOBEC3G は確かに抗 LINE-1 レトロ転移活性を有していることが確認できた。最後にこの APOBEC3G の抗 LINE-1 活性が、抗レトロウイルス活性における主要機能であるところの、deaminase 活性によるものか否かを検討する為に、先程のスプライシング/逆転写した EGFP DNA を複数クローニングしてシーケンス解析を行った。その結果(図 6)、

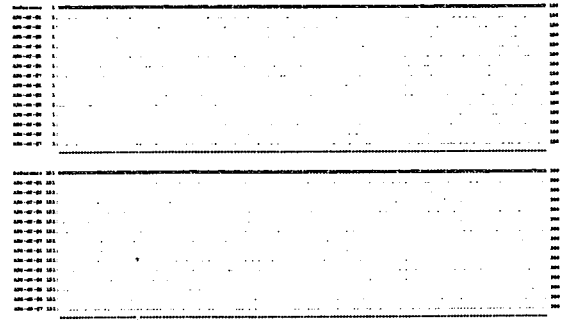


図 6. APOBEC3G の LINE-1 転移抑制における Deamination の欠如

G→A 変異は全く検出できなかったことから、APOBEC3G による LINE-1 のレトロ転移抑制は、deaminase 活性によるものではなく、新たなメカニズムによるものである可能性が示唆された。

2. サブタイプ別 Vif の抗 APOBEC3G 活性の比較検討

1) Vif 蛋白発現における Rev-RRE システム依存性

昨年度、我々は HIV-1 Vif 蛋白の抗 APOBEC3G 活性はサブタイプ依存的で、その活性の強度は C > (A/G) > B > A > A/E の順であることを報告した。が、そこでの A/E の Vif の活性が極めて低く、更に昨年度用いた抗 Vif 抗体は B Vif 特異的であった為、A/E を含む non-B サブタイプの Vif 蛋白の発現は確認できていなかった。また in vivo での transmission における Vif の機能の重要性を鑑みると、A/E Vif の抗 APOBEC3G 活性を異なる実験系によって再検証する必要性が考えられた。そこで本年度まず我々は Vif を有する 4 種の全長プロウイルス

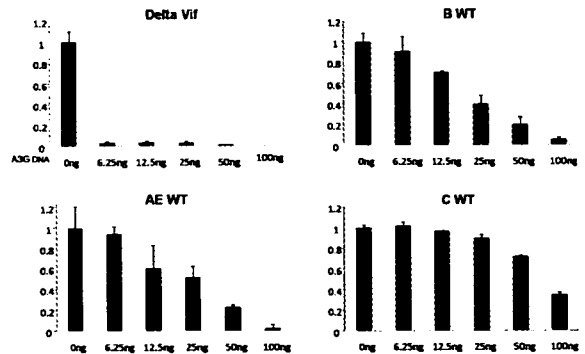


図 7. APOBEC3G に対するサブタイプ別野生型ウイルスの感受性比較

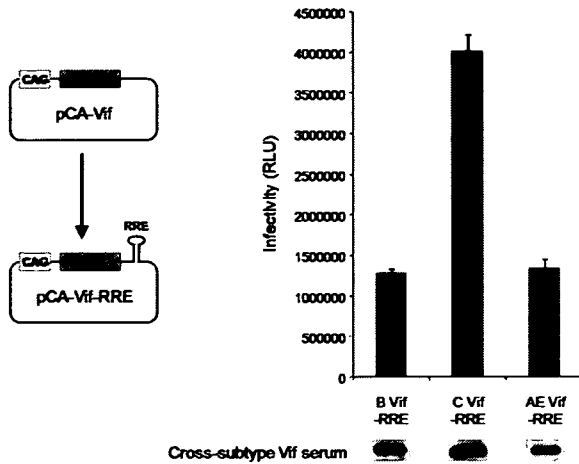


図 8. サブタイプ A/E Vif 発現における Rev-RRE システム依存性

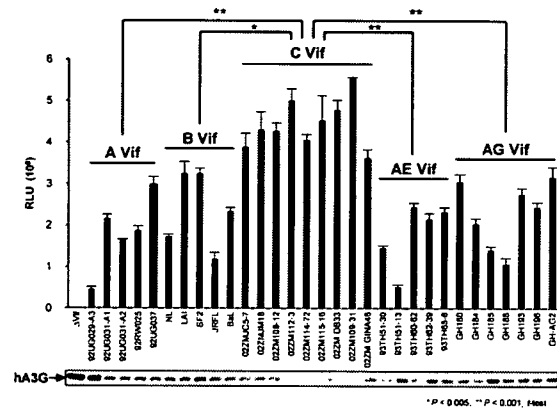


図 9. Rev-RRE システムに基づくサブタイプ別抗 APOBEC3G 活性の再検証

ス DNA クローン (サブタイプ別に B、NL-43; C、02ZM-GINA46; A/E、93TH51-13; 陰性対照、NL-ΔVif)、APOBEC3G 発現ベクターと 293T 細胞にコトランスフェクションした。2 日後に培養上清を回収して p24 を定量、同一 p24 量のウイルスを、それぞれ CD4 陽性の MAGIC5 細胞に感染させた。その結果、図 7 に示すように、サブタイプ C は昨年の結果と矛盾することなく、APOBEC3G に強い耐性を示した。一方、サブタイプ A/E は、B と比べても遜色ないレベルの APOBEC3G 耐性を示したことから、昨年の実験結果に相反する結果となった。この矛盾を説明するに当たり、Vif の発現システムを検討した。昨年度の感染性定量実験系では、発現ベクター pCAGGS を用いて、CAG プロモーターの下流に各サブタイプの Vif 遺伝子を直接挿入したもの (図 8 左上) を Vif 発現ベ

クターとして用いていた。それに対し全長プロウイルス DNA クローンからの Vif 蛋白の発現は、本来の発現システム、即ち、Rev-RRE システムに基づくことから、昨年度作製した Vif 発現ベクターの下流に RRE を挿入したもの (図 8 左下) と、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・ベクター及び Gag-Pol 発現ベクターと Tat・Rev 発現ベクター、VSV-G 発現ベクター、更に APOBEC3G 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、B (NL)、C (02ZM-DB33)、及び A/E (93TH51-13) の 3 種のサブタイプ由来 Vif の抗 APOBEC3G 活性を比較した (図 8 右)。図 7 の全長プロウイルス DNA クローンの実験結果と同様、A/E Vif は B Vif とほぼ同レベルの活性を、また C Vif は以前の結果と同様に高い活性を示した。また今回新たに作製に成功したクロス・サブタイプ抗 Vif 抗体で Vif 蛋白の発現を確認したところ、RRE(-) の A/E Vif 発現ベクターの使用時には認められない Vif の発現 (データ省略) が、RRE(+) の A/E Vif 発現ベクターでは、B 及び C Vif 蛋白の発現レベルと同等であった。このことから、A/E Vif の発現は Rev-RRE システム依存的であり、尚且つ、この発現様式は Vif 蛋白にとって本来のものであることより、今回我々は A/E Vif は B Vif と同程度の抗 APOBEC3G 活性を有すると結論付けた。

2) サブタイプ別 HIV-1 Vif 蛋白の抗 APOBEC3G 活性の再検証、及びその活性に関わる責任領域の決定

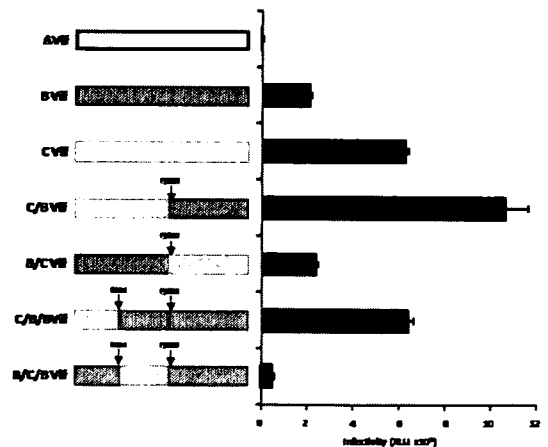


図 10. サブタイプ B-C Vif 間の組換えによる C Vif 高活性規定領域の同定

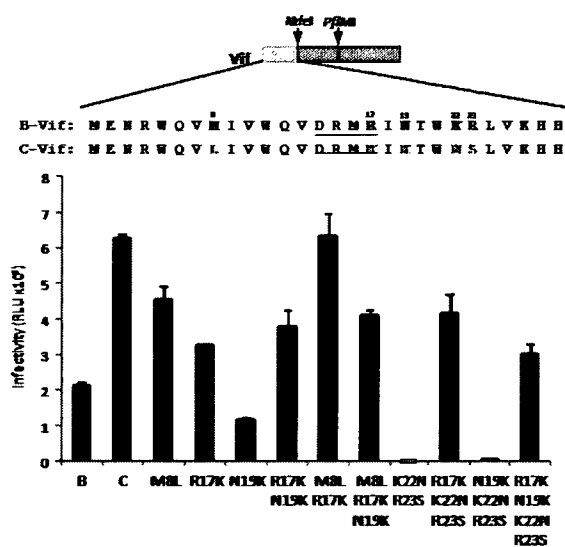


図 11. 点変異体作製によるアミノ酸レベルでの C Vif 高活性規定領域の同定

上記の結果に基づいて、我々はサブタイプ別 Vif 蛋白の活性比較には、この Rev-RRE による発現システムに従うべきであると判断し、昨年度に作製した全てのサブタイプ別 Vif 発現ベクターに RRE を挿入した。それらの抗 APOBEC3G 活性を一斉に比較検討した結果、図 9 に見られるように、昨年 RRE(-) の Vif の結果より若干その差は縮まったものの、C Vif は明らかな統計的有意差 ($P < 0.005$) をもって他のサブタイプ由来 Vif より高い抗 APOBEC3G 活性を示した。またその活性は APOBEC3G への proteasomal degradation 効果と相関していた。

この C Vif の高活性を規定する領域を同定する為に、B Vif との間で組換えを行った(図 10)。まず、サブタイプ間で保存されている Vif 遺伝子中央領域の PflM1 site を利用してその前後を B (NL)・C (02ZM-DB33) 間で組換えた。その結果、C Vif の N 末半分が責任領域であることが分かり、その N 末の中間に位置する NdeI site で組換えを行ったところ、NdeI より上流の N 末端 28 アミノ酸に規定されることが明らかになった。このアミノ酸配列において、B Vif と C Vif の違いは 5 アミノ酸 (M8L, R17K, N19K, K22N, R23S) で、これらの点変異導入をいくつかの組み合わせにより行い、Vif の活性比較を試みた。その結果、図 11 に見られるように、M8L 変異体と R17K 変異体におい

て、partial な活性上昇が認められ、その 2 つを組み合わせさせた M8L/R17K 変異体で、C Vif とほぼ同程度の抗 APOBEC3G 活性が観察された。以上の結果より、我々はサブタイプ C Vif の高活性を規定するアミノ酸は 8 番目と 17 番目のアミノ酸であると結論付けた。

D. 考察

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

今年度はまず、抗レトロウイルス自然免疫 APOBEC3G の本質的な役割を他の APOBEC3 ファミリー蛋白と共に検討した。LINE-1 の細胞内における内在的な mRNA のコピー数を調べたところ、10~100 コピー/細胞の mRNA が発現していることが判明した。となるとこれらの mRNA から、全てではないにしろ多くのコピーから翻訳される LINE-1 の逆転写及びインテグレーションは、正常細胞においては当然、阻害されるべきである。でなければ無秩序なインテグレーションが繰り返されれば、細胞異常が起こる筈である。

その阻害的役割を担うのが APOBEC3 ファミリー蛋白であるか否かを検討する為に、今回、我々は独自に全 7 種類の APOBEC3 ファミリー蛋白の cDNA クローニング (APOBEC3G については昨年度済) を行った。これらの細胞内局在性については、近年、核孔通過可能限界 (passive diffusion limit) の分子量は約 40kD であることが明らかになってきたが、それに矛盾せず、47kD 以上の APOBEC3DE、3F、及び 3G 蛋白は細胞質に局在し、それ以下 (約 25kD) の APOBEC3A、3C、及び 3H 蛋白は細胞質・核内ともに認められた。例外的に APOBEC3B だけは、分子量が 47kD を超えるにも関わらず、核にのみ局在したが、この結果はつい先頃の APOBEC3B が核移行シグナルを有するという報告に矛盾しない。これら APOBEC3 ファミリー蛋白の抗レトロウイルス活性は全て近年の報告と一致していたことから、我々が独自にクローニングした APOBEC3 ファミリー蛋白の生物学的活性を確認することができた。抗 LINE-1 レトロ転移活性そのものについては、EGFP 遺伝子またはネオマイシン遺伝子をマーカーとした 2 つの異なるアッセイ系 (と同時に

LINE-1 そのものの由来する遺伝子も両者で異なる)において、再現的な結果が得られた。即ち、APOBEC3A、3B、3F、3G で強い抑制活性、APOBEC3C、3DE、3H で partial な活性が認められた。この APOBEC3 ファミリー蛋白の抗 LINE-1 活性の強弱と、抗レトロウイルス活性のそれや、細胞内局在性との間に相関性はなかった。

今回の実験結果で特に着目すべき点は、APOBEC3G も強い抗 LINE-1 活性を有するという点であるが、スイスのグループは先頃、これと反対の、APOBEC3G に抗 LINE-1 活性はないという報告をしていた。そこで彼らが用いていた細胞株、143BTK- 細胞を入手し、APOBEC3 ファミリー蛋白の内在的な発現を real-time RT PCR により検討した。その結果(データ省略)、我々が用いた 293T 細胞や HeLa 細胞においては認められない APOBEC3B 及び 3G の高発現が、143BTK- 細胞で観察された。レトロ転移抑制効果が強いこの 2 つの APOBEC3 蛋白の 143BTK- 細胞における内在的な高発現が、恐らく basal level の LINE-1 レトロ転移効率を低下させていた為に、彼らの実験において、APOBEC3G の強発現の効果が認められなかった可能性が考えられる。

我々の実験結果において、APOBEC3G の LINE-1 レトロ転移抑制活性は、この自然免疫蛋白の主たる働きである、deamination (G→A 変異)によるものではないことがシーケンス解析により明らかになった。そのメカニズムとしては、図 5 における APOBEC3G 共発現時の DNA コピー数 (LINE-1 の逆転写効率を反映する)の低下率が、図 4 のレトロ転移アッセイ(インテグレーション効率までを反映する)時の低下率とほぼ一致することから、APOBEC3G がダイレクトに LINE-1 の逆転写を抑えていることが考えられる。これは、APOBEC3G は HIV-1 の逆転写そのものを阻害する活性があるという先頃の報告に矛盾しない。

総括すると、本研究において、全ての APOBEC3 ファミリー蛋白が、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 LINE-1 の転移に対する抑制機能を有していたことから、新たなレトロウイルスの出現に伴って分化してきたと考えられるこれ

ら 3A から 3H までの 7 種類のファミリー蛋白は、モダン・レトロウイルスが出現する以前から有していたと思われるこの prototypic な活性を、今もなお維持しており、その活性は抗レトロウイルス活性の一部としても機能していることが示唆された。

2. サブタイプ別 Vif の抗 APOBEC3G 活性の比較検討

昨年度の実験結果のひとつであるサブタイプ A/E Vif の低レベルな抗 APOBEC3G 活性の矛盾について、再検証することから始めた。昨年度の *in trans* Vif 発現系に対し、本年度はまず本来の *in cis* 発現系、即ち、全長プロウイルス DNA クローンに対する APOBEC3G の発現量依存性を、サブタイプ B、C、及び A/E 間で比較した。C は *trans* 発現系の結果に矛盾せず、APOBEC3G に対する高い抵抗性を示したものの、A/E は B とほぼ同等レベルの活性を示したことから、昨年度の *in trans* Vif 発現系の問題点をまず考察した。

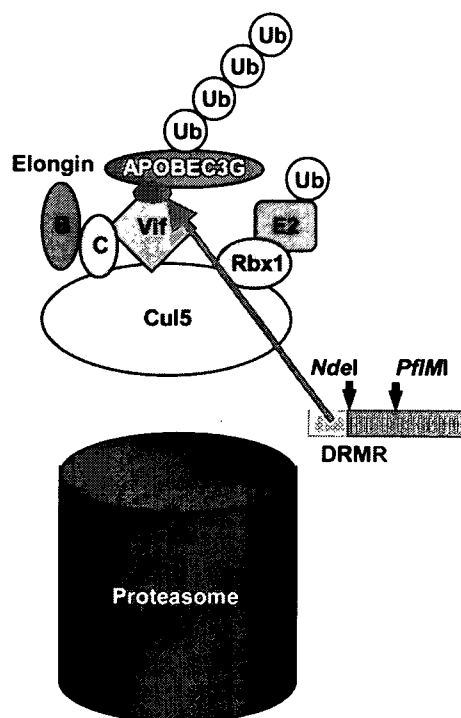


図 12. 今回同定した 17 番目のアミノ酸は APOBEC3G との直接結合に関わる DRMR 領域に含まれる

本来 Vif 蛋白は、全長のプロウイルス DNA から、1 回のスプライシングを経た mRNA より発現されるが、その mRNA は vif 遺伝子の stop codon の下流に env 及び nef の全長配列を有する。よって env 配列内にある RRE も同時に有することになるため、vif の mRNA の核外輸送は、自動的に HIV-1 のウイルス初期蛋白 Rev に依存することとなる。一方、*trans* 発現系の場合一般的な B Vif の場合、単純に vif 遺伝子の open reading frame (ORF) を哺乳類細胞用発現プラスミドに挿入するだけで発現が確認できた為、昨年度はこの系を全てのサブタイプ由来 Vif に適用した。但しそこでの問題は、用いた抗体が結果的に B Vif 蛋白特異的であった為に、non-B Vif 蛋白の発現を確認できなかったことである。我々は、*trans* 発現系においても、前述した Vif 蛋白本来の発現様式、Rev-RRE システムが必要ではないかと考え、vif 遺伝子の ORF の下流に RRE を挿入した。その結果、A/E Vif は、今年度作製に成功したクロス・サブタイプ抗 Vif 抗体によって、まずその発現が確認でき、更にその抗 APOBEC3G 活性も B Vif 並みであることが分かった。サブタイプ B 及び C 由来 Vif に比べて A/E Vif が Rev-RRE システム依存的である理由は明らかではないが、可能性としては、A/E の vif 遺伝子配列が B 及び C 由来よりも AT-rich (データ省略) であるため、mRNA としてその安定性に問題があり、Rev による安定かつ迅速な核外輸送が必要なのではないかと考えられる。いずれにせよ、*trans* 発現系を用いた Vif の活性比較には Rev-RRE システムが必須であるという結果を受け、昨年度に作製した Vif 発現プラスミド全てに RRE を挿入して、再度、サブタイプ間での Vif 蛋白の抗 APOBEC3G 活性の検証を行った。結果は、A、B、A/E、及び A/G 間の差が縮まり、一方、C は統計的に有意な差で高い活性を示し、昨年の結果を再現することに成功した。この結果に基づき、C Vif の高活性を規定する領域の同定を、B Vif との組換え実験により試みたところ、C Vif の N 末 28 アミノ酸により決定されることが判明、更にその領域への点変異導入により、アミノ酸レベルまで絞り込んだ末に、8 番目と 17 番目のアミノ酸が、その活性を規定することが明らかになっ

た。

Vif の APOBEC3G の不活化は、図 12 の様に、Vif が APOBEC3G に直接結合し、また別の領域で Vif が ElonginC 及び Cul5 と結合（前者には ElonginB が、後者には Rbx1-E2 ligase が更に結合）してユビキチンリガーゼ複合体を形成し、プロテオソームに運ばれて分解されることによる。本実験で得られた C Vif の高活性責任領域で非常に興味深いのは、責任アミノ酸の 2 つ、8 番目と 17 番目のうち、後者が APOBEC3G との直接結合に関わることが示唆されている D¹⁴RMR¹⁷ 領域の中に含まれることである。したがって、サブタイプ C Vif が高い抗 APOBEC3G 活性を有するのは、他のサブタイプ由来 Vif に比べて、APOBEC3G への強い結合力により、プロテオソームに持ち込む能力が高いことに起因する可能性が推察される。この点について、現在解析準備中である。

ちなみに今回の組換えはサブタイプ B と C の一株ずつの間で行ったものであるが、例えば B 代表として用いた NL4-3 由来 Vif などは、必ずしも B Vif のコンセンサスな配列を有しているわけではなく、一応、他の株を用いて再検討する必要があることから、現在、別バージョンのキメラ Vif を構築中である。

E. 結論

1) ヒト抗レトロウイルス自然免疫 APOBEC3 ファミリー、3A から 3H までの 7 種類全ての蛋白が、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 LINE-1 のレトロ転移に対する抑制機能を有する。

2) HIV-1 Vif 蛋白の *in trans* 発現には、Rev-RRE システムは必要である。また、サブタイプ C Vif 蛋白は、全てのサブタイプ由来 Vif の中で最も強い抗 APOBEC3G 活性を持ち、その活性は N 末の 8 番目と 17 番目のアミノ酸によって規定される。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakai-Murakami, C., Shimura, M., Kinomoto, M., 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) Kishigami, S., Bui, H.T., Wakayama, S., Tokunaga, K., Thuan, N.V., Hikichi, T., Mizutani, E., Ohta, H., Suetsugu, R., Sata, T. and Wakayama, T. Successful Mouse Cloning of an Outbred Strain by Trichostatin A Treatment after Somatic Nuclear Transfer. *J. Reprod. Dev.* 53:165-170, 2007.
 - 3) Kinomoto, M, Kanno, T, Shimura, M, Ishizaka, Y, Kojima, A, Kurata, T, Sata, T, and Tokunaga K. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 35: 2955-2964, 2007.
 - 4) Kameoka, M., Kitagawa, Y., Utachee, P., Jinnopat, P., Dhepakson, P., Isarangkura-Na-Ayuthaya, P., Tokunaga, K., Sato, H., Komano, J, Yamamoto, N, Oguchi, S., Natori, Y., Ikuta, K. Identification of the suppressive factors for human immunodeficiency virus type-1 replication using the siRNA mini-library directed against host cellular genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359: 729-734, 2007.
 - 5) Kitagawa, Y., Kameoka, M., Shoji-Kawata, S., Iwabu, Y., Mizuta, H., Tokunaga, K., Fujino, M., Natori, Y., Yura, Y. and Ikuta, K. Inhibitory function of adapter-related protein complex 2 alpha 1 subunit in the process of nuclear translocation of human immunodeficiency virus type 1 genome. *Virology* 2008. *In press.*
 - 2) 岩部幸枝、木ノ本正信、石坂幸人、藤本景子、藤田英明、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三：HIV-1 Vpu 蛋白に相互作用する宿主因子の検索。第 55 回日本ウイルス学会総会（札幌）2007. 10.
 - 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総会（札幌）2007. 10.
 - 4) 亀岡正典、北川友紀子、川下理日人、徳永研三、生田和良：タイ国サラブリー県の薬剤未治療 HIV-1 感染者から分離した HIV-1 プロテアーゼの遺伝子型および表現型の解析。第 55 回日本ウイルス学会総会（札幌）2007. 10.
 - 5) 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 21 回日本エイズ学会総会（広島）2007.11.
 - 6) 志村まり、前島一博、宮澤雅之、森美樹、徳永研三、佐多徹太郎、今本尚子、瀧澤俊博、石坂幸人：HIV-1 Vpr による核膜異常。第 30 回日本分子生物学会（横浜）2007. 12.
 - 7) 中井智嘉子、峯本 讓、孫 賓蓮、徳永 研三、佐多徹太郎、石坂 幸人：HIV-1 アクセサリー遺伝子産物 Vpr はウイルスのセントロメア近傍への挿入効率を上昇させる。第 30 回日本分子生物学会（横浜）2007. 12.
- 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

2. 学会発表

- 1) 徳永研三、岩部幸枝、木ノ本正信、巽正志、石坂幸人、倉田毅、佐多徹太郎：HIV-1 Vif のサブタイプ依存的抗 APOBEC3G 活性に関わる責任領域の決定。第 55 回日本ウイルス学会総会（札幌）2007. 10.

10. HIV env 結合因子を利用したウイルス複製阻害

分担研究者 高橋 秀宗 国立感染症研究所 感染病理部 第三室長

研究要旨 抗体、sCD4 等の HIV envelope 結合因子を利用して、複製阻害法を開発することにより、治療、ワクチン開発に役立てることを目的とした。粒子中のコアの成熟に伴い Gag 多量体は収縮することが判明した。さらに収縮により envelope は cytoplasmic tail を通じて影響を受け、envelope を認識する抗 envelope 抗体と共にウイルス表面から排除されることが示唆された。以上はウイルスによって宿主免疫系を回避する一つの機構であると説明しうると考えられた。この機構を利用した治療、また残存した envelope を対象としたワクチン開発も可能であると考えられた。

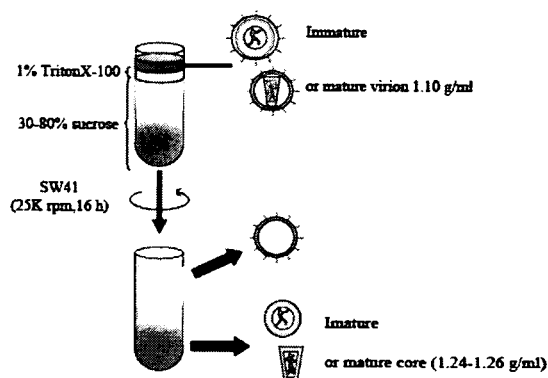
A. 研究目的

抗体、sCD4 等の HIV envelope 結合因子を利用して、複製阻害法を導く方法を開発することにより、治療、ワクチン開発に役立てることを目的とした。コアの成熟に伴う Gag と envelope の関係変化について、ディタージェントを含む蔗糖平衡密度勾配法を用いて解析した。またコアの成熟に伴う粒子表面の envelope 分子について感染実験により解析した。

B. 研究方法

1) HIV-1 粒子中の Gag 蛋白質を還元状態を変えて解析するため、293T 細胞へ Gag 発現ベクターをトランスフェクションした。細胞蛋白または上清の粒子を抗 p24 抗体によるウェスタンブロットで解析した。

2) HIV-1 粒子中のコアを解析するために、Gag-pol 発現ベクターまたは protease にミューテーションが入ったベクターを 293T 細胞へトランスフェクションし、20%蔗糖をクッションに超遠心で濃縮後、tritonX-100 を含む 30-80%蔗糖平衡密度勾配法により、未成熟または成熟コアを分離し、抗 p24 抗体を使用したウェスタンブロットによって解析した。



3) 上記で得られた未成熟または成熟粒子を電子顕微鏡によって観察した。

4) 未成熟または成熟粒子をウサギ抗 p17 抗体と金粒子によって標識し、電子顕微鏡で観察した。

5) HIV-1 粒子中のコアと Env 蛋白の関係を解析するために Gag-pol 発現ベクターまたは protease にミューテーションが入ったベクター、および Env 発現ベクターを 293T 細胞へトランスフェクションし、20%蔗糖クッションを含む超遠心で濃縮後、1% tritonX-100 を有する 30-80%蔗糖平衡密度勾配法により、未成熟コア、成熟コアを分離し、フラクションをそれぞれさらに超遠心により濃縮した。抗 p24 抗体、抗 gp41 抗体を使用した、ウェスタンブロットによって解析した。

6) HIV-1 粒子中のコアと Env 蛋白の関係をさ

らに解析するために Env cytoplasmic tail (CT) の 144 アミノ酸を欠損させ発現させるコンストラクト CT144, または CT116, CT109, CT104 を作成した。上記と同様の方法を使い、未成熟、成熟粒子と Env または Env ミュータントの関係を抗 p24 抗体、抗 gp41 抗体を使用した。ウェスタンブロットによって解析した。

7) コアの成熟に伴い Gag 多量体の収縮に乗じて、Env はウイルス表面から減少するかどうかを調べるために、wt Env および CT144 のプロテアーゼ切断箇所の変異体発現ベクター R506G, CT144R506G を作成した。それぞれ 293T 細胞へのトランスフェクションにより、感染粒子を作成し、p24 ELISA によって標準化した。

8) M8166 細胞へ感染させ、ルシフェラーゼ値を測定した。

9) HIV-1 粒子中の Env 蛋白と感染性の関係を解析するために wt Env, CT144, CT116, または CT104 の量を変えて 293T 細胞で感染粒子を作成した。p24 ELISA によって標準化し M8166 細胞へ感染させ、ルシフェラーゼ値を測定した。

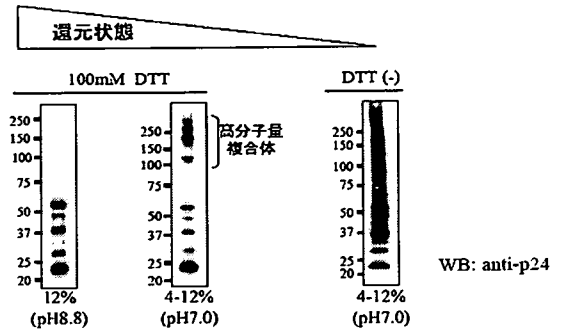
10) HIV-1 粒子の成熟と Env, Env 結合抗体の関係を解析するために wt Env または CT144 を含む粒子を Env のエピトープを認識する抗体の存在下に 293T 細胞に産生させた。24 ELISA で標準化後、M8166 に感染させ、ルシフェラーゼ値を計測した。

(倫理面への配慮)

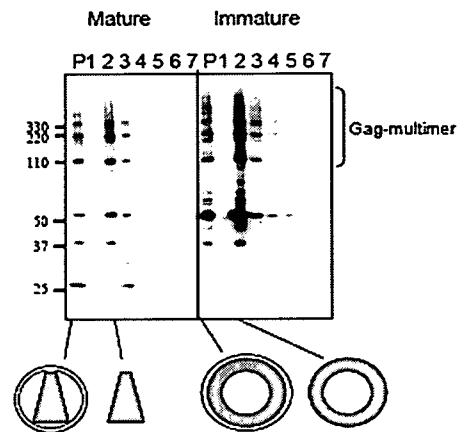
本研究では特に臨床試料を使用していない。

C. 研究結果

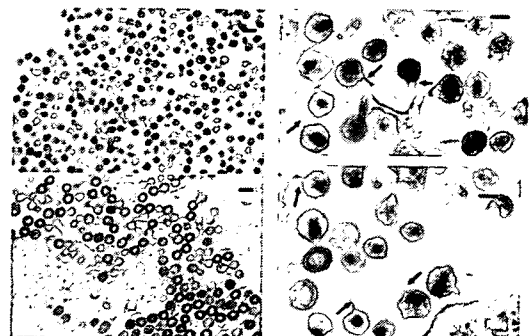
1) HIV-1 粒子中の Gag 蛋白質を還元状態を変えて p24 抗体によるウェスタンブロットで解析したところ、中等度の還元状態で 110 kDa の倍数のラダーを検出した。55 kDa の Gag 蛋白のダイマーがさらに多量体を出芽後に形成していると考えた。



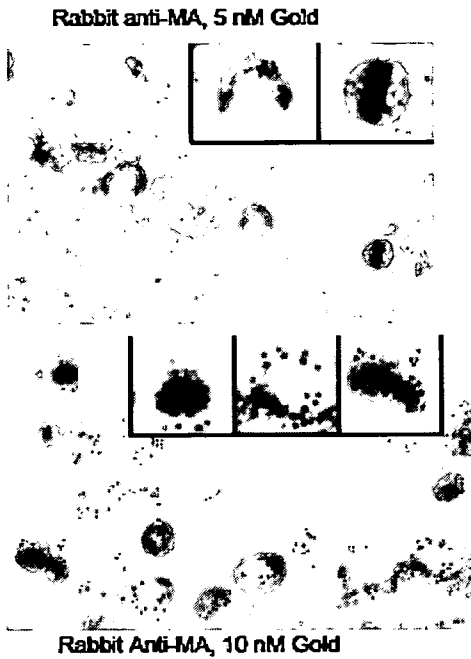
2) HIV-1 粒子中の未成熟、成熟コアを分離して同様に p24 抗体のウェスタンブロットによって解析したところ、Gag 蛋白の多量体によるラダーには差が認められず、成熟コアのフリーな p24 が減少していることなど、構成成分に差が認められず、成熟によって構造変化だけが生じていることを示唆していた。



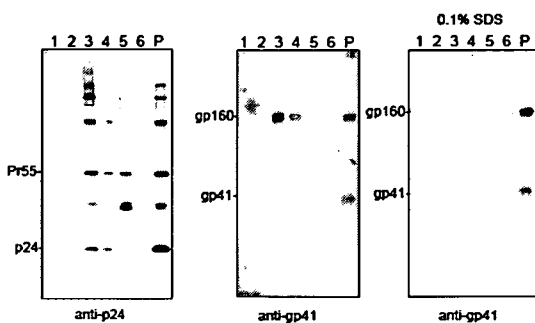
3) 電子顕微鏡による観察では成熟粒子は未成熟粒子より、2割程度直径が減少していた。また成熟粒子にのみ、脂質二重膜によると考えられる、矢印で示す”stalk”を観察した。



4) 感染性粒子をウサギ抗 p17 抗体と金粒子でラベルした抗ウサギ Ig 抗体によって標識し、電子顕微鏡で観察したところ、未成熟粒子ではウイルス膜直下に検出されていた金粒子が、成熟により、中心部に移動して観察された。成熟によってコアの構成成分に変化はなく構造が変化し、コアは収縮していることを示唆していると考えた。

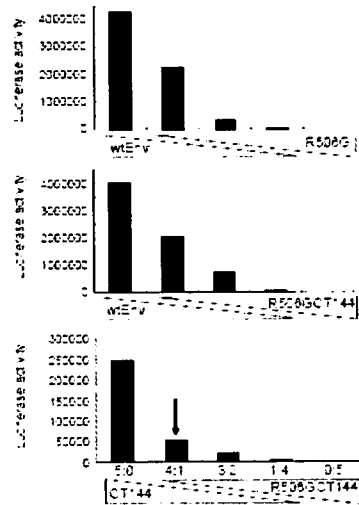


5) HIV-1 粒子中のコアと Env 蛋白の関係を解析するために成熟コアを精製し、抗 p24 抗体、抗 gp41 抗体を使用した、ウェスタンブロットによって解析したところ、コアのフラクションに多量の非切断 Env 蛋白を検出した。0.1% SDS により、Env 蛋白をコアフラクションに検出できなくなったため、非共有結合による結合であると考えた。

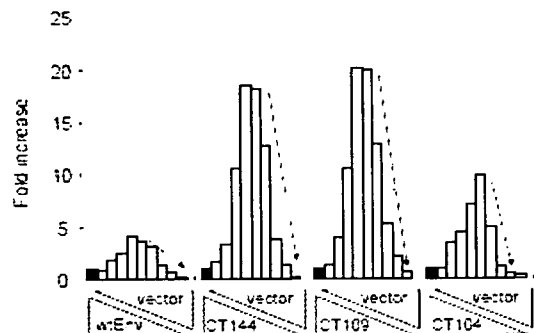


6) Env ミュータントと未成熟または成熟コアの関係を上記と同様にそれぞれ分離し、抗 p24 抗体、抗 gp41 抗体を使用した、ウェスタンブロットによって解析した。CT104 が成熟、未成熟コアフラクションで検出されたものの、CT109 で検出されなくなったため、この間のアミノ酸に Gag 多量体と Env をつなぐ重要なシークエンスがあると考えた。

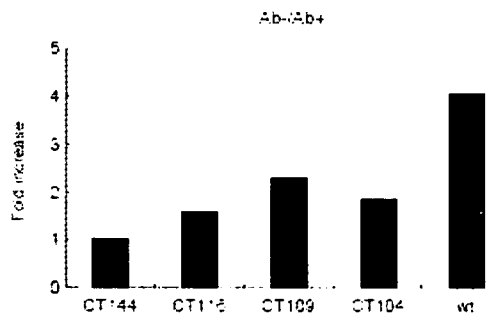
7) wt Env およびプロテアーゼ切断箇所のミュータント R506G または CT144, CT144R506G を有する感染粒子の感染性は、R506G または CT144R506G の粒子中の比率が上昇することによって大きく減少した。特に CT144R506G は感染性を大きく低下させた。



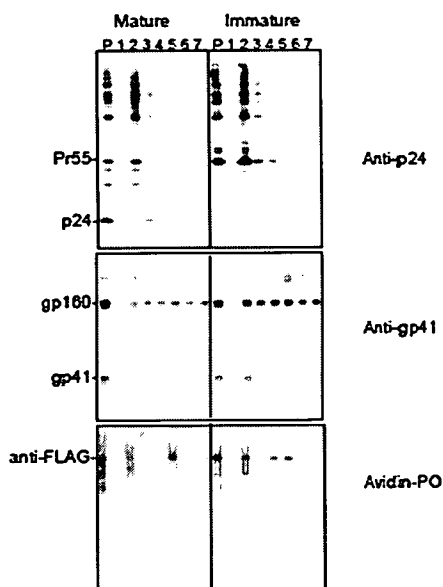
8) wt Env, CT144, CT116, または CT104 の量を変えた感染粒子の感染では、CT の長さが短いと、Env の量変化に伴う粒子の感染性変動が大きいことを示した。



9) wt Env, CT144, CT116, または CT104 を含む粒子を Env のエピトープを認識する抗体の存在下に 293T 細胞に産生させたところ、wt Env を有する感染性粒子は抗 Env 抗体による感染性への影響を顕著に受けた。



10) 成熟粒子、未成熟粒子を抗 Env 抗体存在下に作成した粒子のウェスタンブロットでは、成熟により、コアに集中していた Env と抗 Env 抗体が乖離することが判明した。



D. 考察

HIV-1 粒子を還元状態を変えて解析することによって、中等度の還元状態で 110 kDa の倍数のラダーを検出したことから、55 kDa の Gag 蛋白のダイマーによる多量体が出芽後、形成されると考えた。成熟したコアであっても 110 kDa の多量体が主体であり、未成熟粒子と成熟粒子の構成成分に差が認められないことから、コ

アの成熟によって構成成分の変化が生じているのではなく、構造変化だけが生じていると考えられた。このことを裏付けるように電子顕微鏡による観察では成熟粒子は未成熟粒子より、2 割程度直径が減少しており、成熟粒子にのみ、脂質膜によるあまりであると考えられる "stalk" も観察した。さらに感染性粒子をウサギ抗 p17 抗体と金粒子によって標識し、電子顕微鏡で観察したところ、未成熟粒子で膜直下に検出されていた金粒子が、成熟により、中心部に移動していることが観察され、粒子成熟によるコアの収縮を示唆していた。

粒子中のコアが成熟により収縮していると考えられたことから、Env 蛋白への影響が想定された。成熟コアのウェスタンブロットによる解析では、コアのフラクションに多量の非切断 Env 蛋白を検出し SDS 処理により、検出されなくなったことなどから、非共有結合による Gag 多量体と Env の結合が考えられた。Gag と Env は CT により結合していることが報告されているため、CT の長さを変えたミュータント Env と成熟または未成熟コアの結合解析では、CT104 と CT109 間に重要なアミノ酸領域があることが示唆された。

Gag 多量体の収縮により粒子表面の Env にどのような影響が認められるか、調べるために非切断性のミュータント Env の粒子感染性へ影響を調べた。その結果、CT の欠損した非切断ミュータント CT144R506G の影響が特に大きかったため、CT の欠損によって粒子上の Env は Gag 多量体収縮の影響を受けず、ウイルス表面の Env の量は収縮後も変わらないため、感染性を CT144R506G が大きく減少させたと考えた。逆に wt Env では収縮により Env の量が大きく変化しているので R506G の影響は小さかったと推測した。ミュータントを用いずに wt Env, CT144, CT116, または CT104 の量を変えた感染粒子の感染性を調べた結果でも、CT の長さが短いと、感染性は大きく変動したため、コアの成熟収縮と CT により、ウイルス粒子表面の Env が減少することを示唆している結果であると考えた。

Env を認識する抗体の存在下に作成した粒子の感染性は、逆に CT が長いと影響を強くうけコア成熟時における Env への作用を示唆し

ていた。実際に成熟により、コアに集中していた Env と抗 Env 抗体がコアと乖離する結果が得られたことも以上のモデルを示唆すると考えた。

E. 結論

HIV-1 の Gag は出芽において酸化し、ダイマーからなる多量体を形成している。この未成熟コアはウイルスプロテアーゼによる切断を通じ、成熟における収縮をもたらすと考えた。この収縮は Env CT を通じ、Env に影響を及ぼし、成熟による粒子表面の Env 分子および、成熟以前に Env を認識する抗 Env 抗体のコア、ウイルス表面からの乖離をもたらすと考えた。中和抗体の作用はこのような動きによって封じられる可能性がある。コアの収縮を利用した envelope 結合因子による HIV-1 複製阻害、またコアの収縮後、表面に残存する envelope を標的としたワクチンが可能であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 高橋秀宗、田中恵子、佐多徹太郎. HIV-1 粒子の酸化と成熟. 第 55 回日本ウイルス学会 2007

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許第 4028440 号

平成 19 年 10 月 19 日

mRNA 安定化機構を阻害して抗因子剤として作用する薬剤のスクリーニング系

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

1 1. エイズ発症阻止に関わる宿主因子・病態の研究

分担研究者 岩本 愛吉 東京大学医科学研究所 先端医療研究センター 教授

研究要旨 慢性期の HIV 感染者の血中ウイルス量(セットポイント)を決定する因子を探索するためにセットポイントの低い群と高い群、および治療群の PBMC を用い、非特異的な刺激後に産生するサイトカインを測定、比較した。セットポイントが高い群では IL-2R, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生能が有意に低く、血中ウイルス量と逆相関を示した。MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES は R5-HIV の感染阻害因子であると同時に細胞性免疫応答に重要なケモカインであり、セットポイントを規定する要因のひとつである可能性が示唆された。

A. 研究目的

HIV 感染症では感染直後に一過性の高ウイルス血症を示すが、その後特異的免疫応答の出現と共に血中ウイルス量は減少し、慢性期に移行する。慢性期には比較的安定した血中ウイルス量(セットポイント)が維持されるが、セットポイントは感染個体によって大きく異なり、HIV 感染症の予後と相関する指標として臨床的にも重要とされている。急性期および慢性期の血中ウイルスコントロールには細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が重要な役割をすることが示唆されているが、セットポイントを規定する宿主因子の詳細は不明である。そこで本研究ではセットポイントを規定する因子を探索し、HIV 感染症における免疫病態、AIDS 発症のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

セットポイントは感染個体の重要なパラメーターであり、可能な限り臨床材料を用いた研究が必要と考えられる。また、免疫システムは複雑なネットワークの上に成り立っており、単一の因子について解析を行っても複雑な HIV の感染病態を明らかにすることは困難である。本研究では、患者負担の少ない少量の末梢血を基に、ハードウェアとしては蛍光マイクロビーズアレイを用いた可能な限り網羅的な解析法の開発とその応用研究を目指す。

本年度は、セットポイントの異なる未治療の感染者間で免疫細胞における機能的相違を明らかにするため、末梢血単核球 (PBMC) を用いて免疫応答の調節に重要なサイトカインの産生能について解析を行った。対照群として抗

HIV 治療を行っている HIV 感染者と健康人も同様の解析を行った。

B. 研究方法

1) PBMC の刺激とサイトカイン・ケモカインの測定

HIV 感染者 26 名 (低 HIV 群 13 名 (CD4 数 528 ± 120 , 血中 HIV 量 $\log_{10} 2.94 \pm 0.55$)、高 HIV 群 6 名 (CD4 数 377 ± 114 , 血中 HIV 量 $\log_{10} 4.71 \pm 0.25$)、抗 HIV 治療群 6 名 (CD4 数 563 ± 190 , 血中 HIV 量 $\log_{10} 2.08 \pm 0.68$)、健康人 7 名、計 33 名の PBMC を用いた。PBMC を HIV-Gag たんぱく質全体を網羅するオーバーラップペプチド(Gag-OLP)、あるいは PHA にて刺激し 48 時間後に培養上清を回収した。培養上清中のサイトカインの測定には Biosource 社の Human Cytokine 25-plex Kit を用いた。測定対象としたサイトカインは以下の 25 種類である: IL-1beta, IL-1Ra, IL-2, IL-2R, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, GM-CSF, TNF- α , IFN- γ , IFN- α , IL-8, IP-10, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, RANTES, Eotaxin。(検出限界は 3pg/ml~30pg/ml)。

2) HIV 特異的 CTL の測定

未治療 HIV 感染者 17 人については HIV の Gag, Pol, Env, Nef タンパク質全体を網羅するオーバーラップペプチドを抗原として ELISPOT アッセイを行い、HIV 特異的 CTL の頻度を測定した。

C. 研究結果

1) Gag-OLP 刺激後のサイトカイン産生の比較

HIV 抗原刺激として Gag-OLP 刺激に対して産生されたサイトカインを測定したところ、未治療 HIV 感染者で IL-1 β , IL-2, IL-2R, IL-10, IL-15, IFN- γ , IP-10, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1 が健常人と比して有意に高く、HIV 抗原特異的な T 細胞を介した免疫応答を反映していることが示唆された。低 HIV 群と高 HIV 群を比較したところ、有意差のあるサイトカインは認められなかった。

2) PHA 刺激後のサイトカイン産生の比較

抗原非特異的な刺激に対するサイトカイン産生能を解析するため、PHA 刺激後に産生されたサイトカインの測定を行った。その結果、健常人と未治療 HIV 感染者で IL-1 β のみであった。

低 HIV 群と高 HIV 群を比較したところ、IL-2R, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生が高 HIV 群で有意に低く(図 A)、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生量は血中 HIV 量と逆相関していた(図 B)。その他のサイトカインに関しては同程度の産生が見られ、有意差が認められなかった。治療群において IL-2R, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生量は低 HIV 群と同程度であった。

MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES は生体内で Th1 細胞の遊走に関与しており、細胞性免疫応答の誘導に重要な役割を果たしている。私達はこれらのケモカインの産生量と HIV 特異的細胞性免疫応答(Gag, Pol, Env, Nef-OLP を抗原とした ELISPOT アッセイのスポット数の総和=HIV 特異的 CTL の頻度)の関係性を調べたところ、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生量と CTL 応答の間で弱いながらも相関関係が見られた(図 C)。

D. 考察

セットポイントの高い HIV 感染者において PHA 刺激に対する IL-2R, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生能がセットポイントの低い HIV 感染者に比べて有意に低いことが明らかとなった。治療群では低 HIV 群と同程度での産生が見られたことから高 HIV 群では持続的な抗原刺激により免疫細胞が疲弊した結果、こ

れらのサイトカイン産生が低下したと考えられる。しかしながら昨年度測定した血漿中のサイトカイン濃度の結果では低 HIV 群においても治療群と比して TNF- α , IFN- α などの免疫活性化に関わる多くのサイトカインの血中濃度が高いという知見から、低 HIV 群では持続的な抗原刺激に曝されているにも関わらず機能を維持できているとも考えられ、低 HIV 群特有の何らかの効果的な抗 HIV 作用機序が存在する可能性がある。その他のサイトカインでは低 HIV 群と同程度の産生を示したことから、本研究で見られた IL-2R, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の低下はこれらの遺伝子特異的な現象であり、これらの因子のセットポイント規定への関与が示唆される。

MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES は CCR5 のリガンドであり、Th1 タイプの T 細胞の遊走因子である。抗 HIV 作用として重要な細胞性免疫応答の誘導に関与すると同時に R5-HIV 感染の拮抗因子でもあるこれらのケモカインは、生体内での HIV 抑制に関与する重要な因子であることは明らかであり、その発現調節や HIV 感染阻害に関して詳細な検討が必要である。

E. 結論

本年度は PBMC を用いてセットポイントの異なる HIV 感染者での HIV 特異的、非特異的な刺激に対するサイトカイン産生能の解析を行った。セットポイントの異なる群で PHA 刺激後の IL-2R, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生量に特異的に有意な差が見られ、さらに HIV 特異的細胞性免疫応答と正の相関が見られたことから、個体内での HIV コントロールになんらかの役割を担っていると考えられる。次年度はこれらの因子に注目し、そのメカニズムを明らかにしたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 Research and Human Retroviruses* 23:391-397, 2007.
- 2) Wichukchinda, N., Kitamura, Y., Rojanawiwat, A., Nakayama, E.E., Song, H., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Sawanpanyalert, P., Iwamoto, A., Shioda, T., and Ariyoshi, K. The polymorphisms in DC-SIGNR affect susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS Research and Human Retroviruses* 23:686-692, 2007.
 - 3) Song, H., Nakayama, E.E., Likanonsakul, S., Wasi, C., Iwamoto, A., and 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 J. Immunogenetics* 34:107-113, 2007.
 - 4) Nakayama, E.E., Carpentier, W., Costagliola, D., Shioda, T., Iwamoto, A., Debre, P., Yoshimura, K., Autran, B., Matsushita, S., and 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. *International J. Immunogenetics* 59:511-515, 2007.
 - 5) Liu, H., Nakayama, E.E., Theodorou, I., Nagai, Y., Likanonsakul, S., Wasi, C., Debre, P., Iwamoto, A., and Shioda, T. Polymorphisms in CCR5 chemokine receptor gene in Japan. *International J. Immunogenetics*. 34:325-335, 2007.
 - 6) Hosoya, N., Miura, T., Kawana-Tachikawa, A., Shioda, T., Odawara, T., Nakamura, T., Kitamura, Y., Kano, M., Kato, A., Hironaka, T., Hasegawa, M., Nagai, Y., and Iwamoto, A. Comparison between Sendai virus and Adenovirus vectors in induction of HIV-1 genes into human dendritic cells. In press. *J. Medical Virology*, 2007.
 - 7) Maeda, T., Oyaizu, N., Endo, T., Odawara, T., Nakamura, T., Iwamoto, A., Fujii, T. Pneumocystis jiroveci pneumonia in an AIDS patient: Unusual manifestation of multiple nodules with multiloculated cavities. *European Journal of Radiology*, In Press.
2. 学会発表
- 1) Kawana-Tachikawa A, Miyazaki E, Tomizawa M, Odawara T, Iwamoto A. Highly restricted T cell receptor repertoire against an immunodominant HIV-1 CTL epitope with a stereotypic amino acid substitution. 4th International AIDS Society Conference, Sydney, Australia. July, 2007.
 - 2) Nunoya J, Nakashima T, Kawana-Tachikawa A, Ito Y, Sugimura K, Iwamoto A. Generation of monoclonal antibodies cross-reactive for the wild type and an escape mutant of an immunodominant CTL epitope. 4th International AIDS Society Conference, Sydney, Australia. July, 2007.
 - 3) Kawana-Tachikawa A, Motose M, Odawara T, Fujii T, Iwamoto A. Maintenance of proliferative PD-1low memory CD8⁺T cells specific for eradicated virus in HIV-1 patients with high CD4 count. 15th conference on retroviruses and opportunistic infections. Boston. Feb 2008.
 - 4) 中山香、立川(川名)愛、小田原隆、藤井毅、小島直也、岩本愛吉. HIV セットポイントを規定する免疫関連因子の探索. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌 H18.10.
 - 5) 立川(川名)愛、宮崎恵利子、富澤麻利子、本瀬真樹子、小田原隆、岩本愛吉. エスケープ変異を伴うエピトープ特異的 CD8 陽性 T 細胞の T 細胞受容体 (TCR) レパートリーの解析. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌 H18.10.
 - 6) 布矢純一、立川(川名)愛、岩本愛吉. HIV 由来抗原ペプチドを提示した MHC Class II/ペプチド複合体と特異的に結合する単クローン抗体の作製. 第55回日本ウイルス学会学術集会. 札幌 H18.10.
 - 7) 立川(川名)愛、富澤麻利子、岩本愛吉. HIV-1 変異エピトープ特異的な CD8 陽性 T 細胞における PD-1 発現量の解析. 第3日本免疫学会学術集会. 東京 H18.11

- 8) 立川(川名)愛、朱大勇、本瀬真樹子、富澤麻利子、藤井毅、小田原隆、岩本愛. HIV-1 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子発現量の解析. 第 21 回日本エイズ学会 学術集会. 広島 H18.11

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

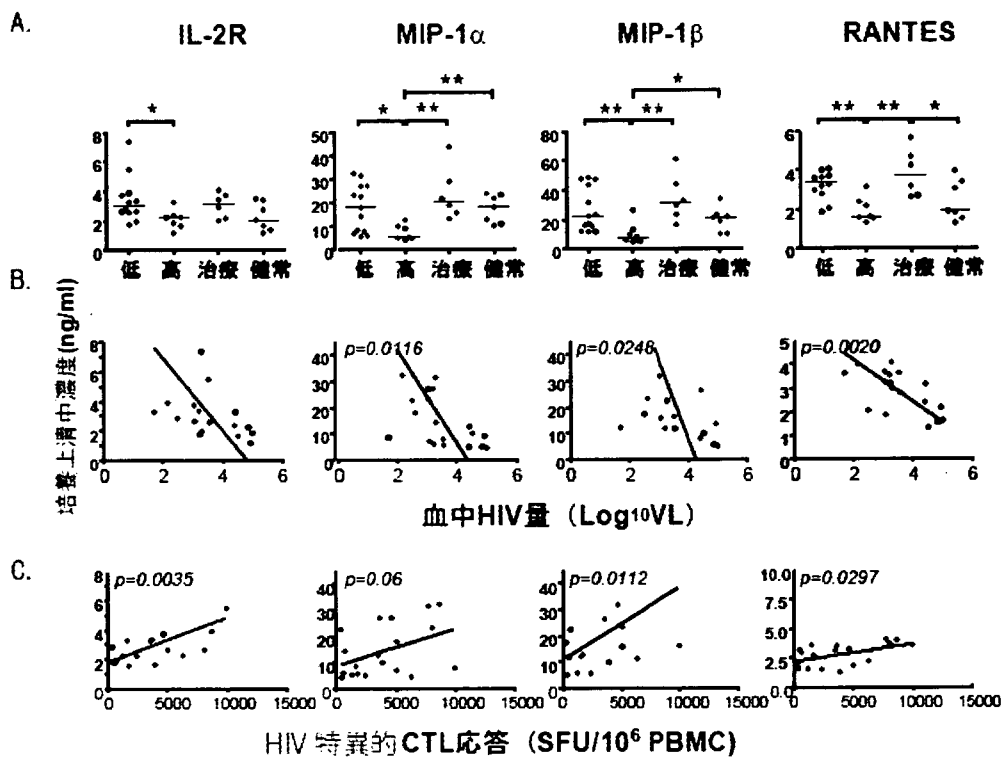


図 低 HIV 群と高 HIV 群で有意差の見られた PHA 刺激により産生されるサイトカイン.
A. 各群間での比較 B. 血中 HIV 量との相関 C. HIV 特異的 CTL 応答との相関

1 2. HIV 感染による中枢神経組織破壊メカニズムの解明

分担研究者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授

研究協力者 北山 裕子 (京都大学ウイルス研究所 大学院生)
石坂 幸人 (国立国際医療センター研究所 部長)

研究要旨 HIV 感染による中枢神経組織の破壊メカニズムを明らかにするために、その組織内でウイルスを産生する感染マクロファージの培養上清中に含まれる神経障害因子の探索研究を行った。その結果、微量の Vpr 蛋白質が感染マクロファージから放出され、さらに、この量の蛋白質はアポトーシスを誘導しないが、神経細胞の分化を抑制することを見出した。その後の細胞科学的解析実験から、Vpr 蛋白質は、神経未分化細胞のミトコンドリア内に集積し、そして、その機能障害を誘導し、その結果、分化過程を抑制することが判明した。さらに、このミトコンドリア透過膜保護薬剤である ubiquinone-10 の添加により、その機能障害は回復し、細胞分化が改善されることがわかった。本研究は、エイズウイルスの神経病原性について、新しい知見を示すものであり、さらにそれに有効な薬剤の発見である。

A. 研究目的

本研究の目的は HIV 感染によるエイズ発症病態のなかで大きな問題である脳症のメカニズム解明とそれに有効な治療薬の開発である。既存の逆転写阻害剤ならびにプロテアーゼ阻害剤などの治療薬はすべて中枢神経系への移行は非常に悪く、臨床的には大きな問題となっている。さらに、HIV はほとんど神経細胞に感染しないながら、中枢神経組織において HIV 感染細胞は脳内に浸潤したマクロファージならびに脳に局在するマクロファージ系細胞であるマイクログリアである一方、明らかに感染者においては神経細胞の脱落が観察される。すなわち、HIV 感染に伴う脳症の発症メカニズムについてはほとんど解明されていない。それは、現在、抗エイズ薬長期服用者が激増している現状からも、どのようなメカニズムにより、HIV が中枢神経組織を破壊するのか明らかにし、有効な薬剤を開発する必要がある。本研究では、HIV 感染マクロファージならびにその中に含まれる Vpr 蛋白質が、神経細胞のミトコンドリアの機能障害を引き起こし、その細胞の分化過程を抑制する事実を見出した。

さらに、このミトコンドリア機能亢進作用のある ubiquinone-10 の添加により、その機能障害は改善し、細胞分化が改善されることを見出した。

B. 研究方法

1) 組換え Vpr と合成 Vpr ペプチド

野生型と変異型組換え Vpr 蛋白質の作製と精製は以前の報告に従った (Cancer Res. 66:627-631, 2006)。合成 Vpr ペプチドの作製は大阪ペプチド研究所に委託した。

2) 神経細胞分化培養

ICR マウス胎児脳組織からの neurosphere 細胞作製は、以前の報告に従った (Exp. Neurol. 184:615-635.2003) poly-L-ornithine hydrochloride ならびに Laminin (Sigma-Aldrich 社)コーティングディッシュにて neurobasal condition medium (CM: 10% FCS 含 B27 supplement 添加 D-MEM high glucose) に組換え Vpr 蛋白質(rVpr)または合成 Vpr ペプチドを添加し分化培養を行った。培養開始後、3 日間、倒立顕微鏡 LEICA CTR 6500 (Leica Microsystems)の 20x あるいは 40x の対物レン

ズにて観察し、神経細胞の分化程度を測定した。

3) 軸索長の測定と分化過程の分類

軸索長の測定は proximal end から distal end までを Leica FW4000 ソフト (Leica Microsystems) を用いて測定した。神経細胞の分化過程は、細胞の形態により 3 つのステージに分類した。lamellipodia (膜状仮足) を形成している細胞を Stage 1、神経突起を形成している細胞を Stage 2、軸索を持つものを Stage 3 と分類した。これらの実験系では 2 人の実験者によるブラインドテストを行った。

4) 試薬

本研究にて使用した試薬類を次に示す。Caspase-3 inhibitor (z-DEVD-fmk) (BD Biosciences)、ubiquinone-10 (UQ) (Sigma-Aldrich)、adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Sigma-Aldrich)、carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) (Sigma-Aldrich)。

5) 生細胞内ミトコンドリアの染色

ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) は、 $\Delta\Psi_m$ sensitive dye である 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) (Invitrogen) にて染色を行い、蛍光顕微鏡 (Leica CTR6500) の 63x 対物レンズにて GFP filter、Texas Red filter 下に観察し、それぞれの蛍光輝度を Leica FW4000 ソフトにて測定した。 $\Delta\Psi_m$ は以下の式を用いて定量した。

$\Delta\Psi_m$ (normalized JC-1 ratio) = (red fluorescence intensity - base fluorescence intensity) / (green fluorescence intensity - base fluorescence intensity)

神経突起内のミトコンドリア輸送速度の測定は、MitoTracker Green FM (Invitrogen) を用いて測定した。MitoTracker で染色した細胞を蛍光顕微鏡の 63x 対物レンズを用いて 10 秒ごとに 120 秒間画像を取得し、神経突起内のミトコンドリアの移動距離と時間をもとに輸送速度を定量した。

6) ミトコンドリアの分離と Western blotting

神経細胞のミトコンドリア分画は、Qproteome™ Mitochondria Isolation Kit (QIAGEN) を用いて分離した。細胞質分画はアセトン沈殿により濃縮した。ミトコンドリア分画、細胞質分画ならびに Whole cell lysate の SDS-PAGE を行い、抗 Cytochrome-c 抗体 (BD Biosciences)、抗 Vpr 抗体 (AIDS Res. Hum. Retroviruses, 23:391-397, 2007)、抗 ANT 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて western blotting を行った。

7) 細胞内 ATP 量の測定

細胞内 ATP レベルは、ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Roche Applied Science) を用いて測定した。Luciferase の輝度は WALLAC ARVO SX 1420 multilabel counter (Perkin Elmer) にて測定した。

8) 統計学的処理

統計学的解析は、one-way ANOVA により行った。多重比較は Student's *t* test を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本動物実験の施行にあたり、本学実験施設に設置されている実験動物委員会から動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な実験施行を行うように指導を受けた。すべての実験は本委員会より承認されている。

C. 研究結果

1) HIV 感染マクロファージならびに Vpr 蛋白質の神経細胞分化抑制作用

昨年の本研究報告書に記載したように、HIV 感染マクロファージ培養上清の添加により、マウスの脳分離神経細胞 (神経未分化細胞を含む) を血清添加により貼付け培養を行うと神経細胞の分化抑制が見られる。上述したように、Stage 1 (膜状仮足形成細胞)、Stage 2 (神経突起形成細胞)、Stage 3 (軸索形成細胞) と分類し、HIV 感染マクロファージ培養上清の添加後、48 時間目まで観察すると、Stage 2 と Stage 3 の段階での抑制が明らかに見られる。そこで、この分化抑制作用におけるウイルス蛋白質の関与を明らかにするために、HIV に対する抗体添加実験を行っ

た。その結果、抗 Vpr 抗体の存在下では、明らかに中和され、再び Stage 3 まで分化した細胞の数が増加した。一方、同じ HIV の構成蛋白質である MA 蛋白質に対する抗体の添加では神経細胞分化の抑制の改善は見られなかった(結果示さず)。そこで、Vpr 蛋白質そのものが、神経細胞分化抑制作用があるか否かを検討した。組換え Vpr 蛋白質 (rVpr) を神経未分化細胞に添加し、分化誘導実験を行った。その結果、多量の rVpr 存在下 (図 1D では 1 nM) では、その細胞は Caspase3 陽性となり (表 1)、Vpr 蛋白質はアポトーシスを誘導し (図 1D の野生型 Vpr 蛋白質(WT) 添加により Cytochrome-c を細胞質に遊離させる)細胞障害、ならびに、分化抑制作用があることを確認した。しかし、少量の Vpr 蛋白質存在下ではアポトーシスは見られないながら (表 1、図 1D の 2 pM WT 存在下では Cytochrome-c をほとんど細胞質に遊離させない)、分化抑制作用のみが見られた。この分化抑制作用のみを誘導する Vpr 濃度は、HIV 感染マクロファージ培養上清中に含まれている Vpr 量に相当する 2 pM であった。そして、その分化抑制段階は、Stage 2 から Stage 3 への過程であること、すなわち、2 pM の Vpr により軸索伸長過程が阻害されることがわかった (図 1C に示すように WT 添加により Stage 2 の細胞が非添加(C-CM)より増える)。そして、この軸索伸長過程において、rVpr 添加により、ミトコンドリア膜電位 ($\Delta\Psi_m$) が低下すること (図 1B に示すように rVpr 添加により $\Delta\Psi_m$ が低下する)、ATP 産生が低下すること (図 2B)、そして、軸索へのミトコンドリアの移動が明らかに抑制されていること (図 2C に示すように 2 pM の rVpr 添加により軸索内移動(Velocity)が低下する) がわかった。次に、Vpr 蛋白質の分化抑制作用の特異性を確認するために、種々の rVpr 蛋白質変異体あるいは合成 Vpr ペプチドを準備し (図 1A)、その $\Delta\Psi_m$ 抑制活性 (図 1B) と神経細胞分化抑制活性 (図 1C) を検討した。その結果、 $\Delta\Psi_m$ 抑制活性と神経細胞分化抑制活性とは、完全に相関し、Vpr 蛋白質の 73, 77, そして 80 番目のアミノ酸である arginine を alanine に置換した変異体 (R73, 77, 80A) は

完全に活性を消失すること、これらのアミノ酸領域を一部包含する rVpr あるいはペプチドは軽度の抑制活性を有することより、73, 77, 80 番目の arginine が重要なドメインであることを見出した (図 1B と C)。次に、Vpr 蛋白質の WT ならびに変異体 R73, 77, 80A の添加細胞内におけるミトコンドリアへの局在を確認するために、ミトコンドリアに局在する Cytochrome-c 蛋白質、Vpr 蛋白質、あるいは、Vpr に結合するミトコンドリア内膜 translocator 蛋白質(ANT)に対する抗体を用いて Western blotting を行った。その結果、細胞外に添加した rVpr 蛋白質はミトコンドリア分画 (Cytochrome-c ならびに ANT 陽性分画) に添加量に依存して集積し、さらに Vpr 変異体である R73, 77, 80A も同じように集積することが確認された (図 1D)

2) ubiquinone-10 による Vpr 誘導性ミトコンドリア機能不全の回復

これまでの結果は、Vpr 蛋白質は少量の存在下においても細胞内ミトコンドリアに集積し、その機能不全を誘導し、神経細胞の分化抑制作用を発揮することを示している。ところで、ミトコンドリアの PTP (permeability transition pore) を開口させ、ミトコンドリア膜電位を低下させる FCCP などの化学物質に対して拮抗的に作用する ubiquinone-10 (UQ) はよく知られている。UQ はミトコンドリア内膜内のプロトン膜間腔に輸送させ、その結果、酸化的リン酸、すなわち、ATP 産生を亢進させる。実際、ミトコンドリア筋症などの遺伝性疾患に対して UQ の大量投与は、これらの患者の神経症状ならびに筋肉障害症状を改善しうることは知られている。そこで、UQ が Vpr 蛋白質によるミトコンドリア機能障害を改善しうるか否かを検討した。まず、これまで用いてきた神経未分化細胞に FCCP 添加による膜電位低下効果を UQ は抑制しうるか確認したところ、予想したように FCCP による抑制活性を UQ 添加により解除することができた (図 2A)。そして、Vpr による膜電位低下作用は、Caspase 3 阻害剤である z-DEVD(100uM)あるいは ATP(10uM)の添加では解除できないが、UQ は(100 uM)にて解

除することができた。Vpr 蛋白質による、ATP 産生低下 (図 2B)、軸索内移動(Velocity)の低下 (図 2C)、細胞分化の抑制 (図 2D)、そして、軸索伸長の抑制 (図 2E) のいずれも UQ の添加により解除された。特に、UQ 単独に加え α -DEVD をさらに加えると、その回復効果は増加した (統計学的有意差はなかったが)。すなわち、UQ は Vpr により誘導されるミトコンドリア機能不全を改善する効果がある。

D. 考察

本研究は HIV 感染による神経組織破壊メカニズム解明のひとつとして、微量の Vpr 蛋白質は、神経未分化細胞のミトコンドリアに蓄積し、その機能不全、特に軸索内へのミトコンドリア移動阻害を引き起こすために、その細胞の分化を抑制しうることを示すものである。さらに、このミトコンドリア障害は、ubiquinone-10 の添加により回復する可逆性のものであること、また、ubiquinone-10 が広く臨床の場にて使われている薬剤であることを勘案すると、今後、エイズ脳症患者における神経細胞の再生を促す薬剤としての可能性が強く示唆される。将来の有効な治療薬の開発に寄与する研究の推進であると考えられる。

E. 結論

エイズ脳症治療薬の確立に向けて一定の学問的進歩が得られた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya JI, 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. Retroviruses* 23:391-397, 2007.
- 2) Futahashi, Y, Komano J, Urano E, Aoki T,

Hamatake M, Miyauchi K, Yoshida T, Koyanagi Y, Matsuda Z, and Yamamoto N. Separate elements are required for ligand-dependent and -independent internalization of metastatic potentiator CXCR4. *Cancer Science* 98:373-379, 2007.

- 3) Miyano-Kurosaki N, Kira J, Barnor JS, Maeda N, Misawa N, Kawano Y, Tanaka Y, Yamamoto N, and Koyanagi Y. Autonomous proliferation of HTLV-CD4+ T cell clones derived from human T cell leukemia virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy patients. *Microbiol. Immunol.* 51:235-242, 2007.
 - 4) Sato K, Aoki J, Misawa N, Daikoku E, Sano K, Tanaka Y. and Koyanagi Y. Modulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity through incorporation of tetraspanin proteins. *J. Virol.* 82, 1021-1033, 2008.
 - 5) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, and Koyanagi Y, Human immunodeficiency virus type-1 vulnerates nascent neuronal cells. *Microbiol. Immunol.*, in press.
 - 6) Koyanagi Y, Tanaka Y, Ito M, and Yamamoto N, Humanized mice for human retrovirus infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, in press.
 - 7) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, and Koyanagi Y. A CD63 mutant inhibits T-cell tropic HIV-1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic*, in press.
 - 8) 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.* in press.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Koyanagi Y. HIV-1-infection in humanized mice. Innovation forum of Tohoku University US office, San Francisco, 2007.

- 2) Sato K, Aoki J, Daikoku, E., Sano, K., Tanaka, Y., Koyanagi, Y.: Tetraspanin on HIV-1 virions inhibits its infection. 14th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Los Angeles, 2007.
- 3) Sato K, Misawa N, Ito M, Koyanagi Y. High level of HIV-1 viremia and CD4 depletion in human CD34+ cell-engrafted mice. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2007.
- 4) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. Human Immunodeficiency Virus-1 Vpr inhibits neurite outgrowth via caspase-3-independent pathway, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2007.
- 5) Yoshida T, Kawano Y, Ando Y, Sato K, Komano J, Miura Y, Tanaka Y, Koyanagi Y. CD63 and its mutants inhibit fusion of CXCR4-containing vesicles to the plasma membrane and block X4 HIV-1 entry, Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2007.
- 6) Sato K, Daikoku E, Sano K, and Koyanagi Y. Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity through Incorporation of CD63, Awaji symposium, Awaji, 2007.
- 7) Koyanagi, Y.: Foundation and Recent Progresses in Retrovirus Research, Awaji symposium, Awaji, 2007.
- 8) Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr inhibits axon formation that leads to impaired repairment of synaptodendritic connections through induction of mitochondrial dysfunction. 8th AIDS seminar in Kumamoto. 2007.
- 9) Koyanagi, Y.: HIV-1 viral protein R inhibits axon formation that leads to impaired repairment of synaptodendritic connections through induction of mitochondrial dysfunction. A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of HIV-1-induced cell death. 14th East Asia symposium, Tokyo, 2007.
- 10) Koyanagi, Y.: "Mitochondria and membrane trafficking" implication for HIV infection and pathogenesis. 10th Anniversary symposium of Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, 2007.
- 11) 小柳義夫. HIV-1 感染ヒト造血マウス. 第 31 回阿蘇シンポジウム、熊本.
- 12) 芳田剛、河野祐治、安藤良徳、佐藤佳、駒野淳、三浦義治、田中勇悦、小柳義夫. 膜輸送変換による HIV-1 感染阻止ストラテジー. 近畿エイズ研究会、大阪、2007.
- 13) 芳田剛、安藤良徳、小柳義夫. HIV のコレセプターである CXCR4 の細胞内輸送. ウイルス学会湯河原キャンプ、湯河原、2007.
- 14) 芳田剛、安藤良徳、小柳義夫. CXCR4 トラフィッキング過程の可視化と遺伝子導入による HIV-1 感染阻害. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007
- 15) 北山裕子、安藤良徳、三浦義治、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV-1 Vpr 誘導性ミトコンドリア機能障害による神経細胞軸索伸長の阻害. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
- 16) 小柳義夫、三沢尚子、北山裕子、佐藤佳、渡部匡史、Johnny Chuanyi Nie、伊藤守. HIV-1 感染ヒト造血細胞移植マウス内に維持される長期高ウイルス血症. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
- 17) 篠田康彦、田中勇悦、鈴木陽一、三浦義治、小柳義夫. インターフェロンオメガ 1 による HIV-1 感染抑制. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
- 18) 安藤良徳、北山裕子、三浦義治、川口寧、小柳義夫. HSV-1 感染による中枢神経組織障害の経時的解析. 第 55 回日本ウイルス学会、札幌、2007.
- 19) 北山裕子、安藤良徳、三浦義治、星野重樹、石坂幸人、小柳義夫. HIV 感染による認知障害機構 : Vpr によるミトコンド