

200830010 B

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染とエイズ発症の阻止および 治療に関わる基礎研究

平成18～20年度 総合研究報告書

平成21年3月

研究代表者 佐多 徹太郎

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染とエイズ発症の阻止および 治療に関わる基礎研究

平成18～20年度 総合研究報告書

平成21年 3 月

研究代表者 佐 多 徹太郎

(国立感染症研究所)

エイズ対策研究事業
「HIV感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究」班
班員名簿（平成18-19年度）

佐多徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部長
横田 恭子	国立感染症研究所・免疫部第1室	室長
田中 勇悦	琉球大学医学部・感染免疫学	教授
宮澤 正顕	近畿大学医学部・免疫学教室	教授
神奈木真理	東京医科歯科大学大学院・医歯学総合研究科・免疫治療学研究室	教授
有吉 紅也	長崎大学熱帯医学研究所・感染症予防治療分野	教授
高橋 秀宗	国立感染症研究所・感染病理部	室長
塩田 達雄	大阪大学微生物病研究所	教授
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
徳永 研三	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
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
立川 愛	東京大学医科学研究所・先端医療研究センター	助教
小柳 義夫	京都大学ウイルス研究所	教授

目 次

I. HIV 感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究

総合研究報告書（平成 18-20 年度）・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1

研究代表者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

II. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9

I. 総合研究報告書

HIV 感染とエイズ発症の阻止および治療に関わる基礎研究

研究代表者 佐多徹太郎 国立感染症研究所 感染病理部 部長

研究要旨 本研究班では、HIV 感染病態の基礎的な解析に焦点をあて、そこから得られる情報をもとにして、感染防御免疫機構の増強、HIV 増殖抑制そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てる。(1) HIV 感染免疫防御機構、(2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析、(3) HIV 感染病態の解明を 3本の柱として、HIV 感染やエイズ発症の阻止、治療に繋がる基礎的研究を行う。研究成果は以下である。HIV 増殖抑制により Gag 特異的 CD4+T細胞増殖応答を回復させた。樹状細胞 (DC) から CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 感染伝播を阻害した。DC から CD4 陽性 T 細胞への HIV 感染伝播には T 細胞活性化が低レベルである必要があることが明らかとなった。Treg 誘導性 DC の分化培養方法を確立し、ある環境下では、Treg が HIV-1 の感染増殖を抑制する機能をもつことを明らかにした。Poly I:C による DC への分化培養法を見出した。OX40/OX40L 発現誘導または可溶性 OX40L により HIV-1 増殖を抑制した。HIV 曝露非感染者の持つ染色体の遺伝的特徴を、*Gene1* イントロンまたは *Rac2* イントロンにおける塩基配列多型の集積として同定した。HIV-1 Nef は自然免疫応答を抑制し HIV-1 感染を有利にする可能性がある。NK 感受性 K562 細胞、TLR3 あるいは TLR4 の刺激により HIV-1 複製を抑制した。共生細菌に TLR3、4 の刺激によるインターフェロン β を介した HIV-1 複製抑制類の効果を見出した。CRF01_AE 株の Gag CTL エピトープを新たに 8 箇所発見した。CTL 免疫圧によって生じる Gag アミノ酸変異の中で高 CD4 値、低ウイルス量など臨床経過に良い影響を与える T242 を見出した。ウイルス成熟によりウイルス表面の env、env 認識抗体が減少した。中和抗体誘導抗原の候補が得られた。HIV-1 に暴露されながらも感染を免れている人には遺伝子多型が 12 箇所見出された。HIV-2 の TRIM5 α 感受性はヒトとカニクイサルとで共通であった。HIV-2 カプシドタンパク質の変異はヒト TRIM5 α 感受性を変化させることでウイルス増殖に影響した。ヒト TRIM5 α の遺伝子多型に抗 HIV-1 活性を減弱させるもの、増強させると考えられるものを見出した。HIV-1 陽性患者血中に Vpr を見出した。HIV-1 インテグレーションの過程にゲノム DNA 二重鎖切断が関与していた。X-線照射によってウイルス感染効率は上昇し、ゲノム DNA 二重鎖切断サイトへウイルス DNA は挿入されることが判明した。HIV-1 Vif 蛋白の抗 A3G 活性はサブタイプによって異なり、プロテアソーム分解能に相関していることを見出した。サブタイプ C の Vif 蛋白は、最も強い抗 APOBEC3G 活性を有した。サブタイプ C の Vif 蛋白は結合親和性により抗 APOBEC3G 活性を規定した。粒子形成に関与する新規の宿主因子 BCA2/Rabring7 を同定した。HIV 感染者血漿中の IP-10 が血中 HIV 量と相関することを見出した。血中ウイルス量の高い群で IL-2R, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES の産生能が有意に低かった。感染者では MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生以外に、免疫機能が質的に大きく異なっていた。ラット脳海馬スライス培養系を用いて、HIV-1 感染マクロファージが誘導する特異的神経細胞障害過程を明かとし、エイズ患者の神経細胞分化抑

制の過程の詳細なメカニズムを明らかにしつつある。ミトコンドリア透過膜保護薬 ubiquinone-10 は、Vpr による神経細胞障害を改善した。神経・グリア細胞にウイルス遺伝子が組み込まれ、ウイルス由来蛋白が発現するとその細胞ないし周囲の細胞がアポトーシスをおこすことが示唆された。グリア細胞での持続感染は、ミクログリア細胞へのウイルス供給源となることもわかった。SIV 感染による神経・グリア障害に ERK 活性化によるアポトーシスが関与している可能性があった。

研究分担者：

横田恭子 国立感染症研究所室長
田中勇悦 琉球大学医学部教授
宮澤正顯 近畿大学医学部教授
神奈木真理 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科教授
有吉紅也 長崎大学熱帯医学研究所教授
高橋秀宗 国立感染症研究所室長
塩田達雄 大阪大学微生物病研究所教授
石坂幸人 国立国際医療センター研究所部長
徳永研三 国立感染症研究所主任研究官
梁 明秀 国立感染症研究所エイズセンターグループ長
岩本愛吉 東京大学医科学研究所教授
立川 愛 東京大学医科学研究所助教
小柳義夫 京都大学ウイルス研究所教授

A. 研究目的

全世界のみならず国内でも HIV 感染者およびエイズ患者は増加している。エイズ克服には感染予防をめざしたワクチン開発が最も重要ではあるが、多くの臨床試験が頓挫しているのが現状である。一方、HAART の開発により HIV 感染者の予後は著明に改善されたが、長期毒性の出現、服薬遵守の不徹底と薬剤耐性ウイルスの出現など、深刻な問題が生じている。HIV 感染病態の基礎的な解析に焦点をあて、そこから得られる情報をもとにして、感染防御免疫機構の増強、そして抗 HIV 薬剤やワクチン開発に役立てることが必要である。

1) HIV 感染免疫防御機構

樹状細胞

(DC) による抗原提示は抗原特異的 T 細胞の活性化と同時に潜伏 HIV を再活性化すると想定されるため、HIV 増殖と活性化 T 細胞の性

状を同時に解析して DC による抗原提示機能の増強と HIV 増殖制御を図る (横田)。免疫応答を調整する DC 群の分化培養法を確立し、in vivo の T 細胞免疫応答の調節能および HIV-1 の増殖調節能を比較することにより、新たなエイズ予防および治療法の開発に寄与する。OX40/OX40L 発現誘導を通じた HIV 増殖抑制を開発する (田中)。HIV 曝露非感染者の遺伝的特徴として第 22 染色体の特定の遺伝子が曝露非感染者でのみ強く発現していることを見出したので、その発現調節機構を解明し免疫治療に役立てる。HIV-1 複製抑制における *Rac2* 遺伝子座イントロン多型の機能部位及びマウス *APOBEC3* の機能差を規定する多型領域の絞り込みを行う (宮澤)。HIV-1 抑制状態を誘導する細胞分子およびシグナルの検索と HIV-1 抑制機構解析を行い、生体分子を標的とした HIV-1 複製抑制方法を確立し感染防御を達成する。自然免疫による HIV-1 防御機構を解明し、その誘導方法を開発する (神奈木)。エイズ進行遅延型 HIV 感染者に特異的な CTL エピトープを発見し、その抗原提示効率を評価し、ワクチン開発に役立てる。宿主細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 免疫とウイルスの相関関係を分子レベルで解明する (CTL) エピトープを同定する (有吉)。抗体、sCD4 等の HIV env 結合因子を利用して、複製阻害法を導く方法を開発する (高橋)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

HIV-1 感染者ならびに非感染者の遺伝的多型を検討し、エイズの病態進行の予測を可能にし、感染防御に関わる未知の宿主因子を明らかにする。TRIM5α の変異により抗 HIV-1 効果に変化するかどうか、および HIV-2 のカプシドタンパク質 158、178 番目のアミノ酸のウイルスに

対する影響を明らかにする(塩田)。ゲノム DNA の二重鎖切断(以下 DSB)と IKK 依存的なシグナル伝達機構を明らかにし、マクロファージ感染に対して阻害効果を示す因子の開発に向けた情報を得ることにより、新たな創薬の可能性が期待される。DSB が静止マクロファージ(Mφ)へのウイルス感染効率を上げることおよび Vpr 蛋白質の IL-6 産生における機序を明かとする(石坂)。APOBEC3G および HIV-1 Vif 蛋白による宿主の防御機構とウイルスの回避機構について検討し、自然免疫増強する薬剤の開発やワクチン、遺伝子治療に資する(徳永)。HIV の粒子形成に関与する宿主因子を同定し、HIV 粒子形成の分子機構を解明する(梁)。

3) HIV 感染病態の解明

HIV 感染症の自然経過および治療による病態修飾に関連した HIV 特異的 CTL を解析し、エイズ発症阻止や治療法の向上に結実させる。慢性期 HIV 感染者の血中ウイルス量(セットポイント)を規定する因子を探索し、免疫病態、AIDS 発症のメカニズムを明らかにする。「HIV 量」と「MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES 産生能」との因果関係について詳細に解析する(岩本、立川)。HIV が感染した中枢神経組織内における、神経組織の機能維持と神経細胞の分化成熟過程への影響を明らかにし、エイズ脳症の発症機序を解析する。HIV 感染による中枢神経組織破壊機構を明らかとし、有効な薬剤を開発する。HIV 感染マクロファージがどのように、脳組織のどの細胞を障害するのかを解明する(小柳)。HIV 脳症の病態について *in vitro* 培養系を用いて解析し、発症阻止、予防および治療に重要な知見を見出す。ミクログリア、アストロサイト、神経細胞における SIV の感染動態を詳細に解析する(佐多)。

B. 研究方法

1) HIV 感染免疫防御機構

抗原特異的 T 細胞株を効率よく樹立する方法を確立し、抗原提示機能について解析する。抗原特異的 T 細胞活性化を検出するため FRET を選択し、DC からの HIV 伝播阻害にはレンチウイルスベクターにより siRNA を発現させた。蛍光マーカー発現 HIV-1 を作製し、FACScalibur

により T 細胞への感染、ケモカインレセプターの発現を解析した(横田)。強力な免疫誘導活性をもつ DC と免疫抑制性 DC の培養方法を開発する。DC の分化培養法を変え、OX40/OX40L 誘導と HIV-1 増殖への影響を調べた。DC の分化誘導法に検討を加え、OX40L による HIV-1 増殖への影響を調べた(田中)。ヒト第 22 染色体遺伝子エンハンサー領域の多型の機能性を検定する。また遺伝子組み換えマウスでの解析を行う。HIV-1 複製抑制における Rac2 遺伝子多型の機能解析とマウス APOBEC3 の機能差を規定する多型領域の解析(宮澤)。CD28-B7、TLR ファミリーを含む免疫関連分子群の抗体あるいは可溶性抗原を用いて CD4 陽性細胞およびマクロファージの HIV-1 複製を抑制する分子を調べて活性を確認する。NK 感受性 K562 細胞または Toll-like receptor (TLR) の刺激による HIV-1 複製への影響について検討した。標的マクロファージを調整し Toll-like receptor (TLR) 2、3、4、5、7/8 のリガンド刺激による HIV-1 複製への影響について検討した(神奈木)。15 アミノ酸領域まで CTL エピトープ領域を同定する。臨床株 gag 発現ベクターの作成を行う。北タイで夫婦間伝播が確認できた 65 組において、特定 HLA に関連したウイルスアミノ酸変異の変化を調べた。オーバーラッピングペプチドを用いて Gag CTL のエピトープをマッピングした(有吉)。HIV-1 粒子の成熟に伴う Gag の変化、Gag と Env の関係、さらに粒子表面の Env、Env 認識抗体について解析した。HIV-1 Core-Env を精製、マウスに免疫し、血清の中和アッセイを行い、ハイブリドーマを作製した(高橋)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

タイランパンコホートの HIV-1 感染者の性的パートナーで HIV-1 陰性者の遺伝子多型 1 万箇所について解析し、HIV-1 感染感受性に関わる新たな遺伝子多型を見出す。HIV-2 のヒト、カンクイサル TRIM5 α に対する感受性、HIV-2 の株間における TRIM5 α 感受性の違い、及び TRIM5 α の一塩基多型 43Y の影響を調べた。HIV-2 GH123 株のカプシドタンパク質に変異を導入し、ウイルス増殖を検討した。変異 TRIM5 α 発

現における、HIV-1 ならびに HIV-2 の増殖を検討した (塩田)。Vpr による DSB 誘導に必須の領域を明らかにする。HIV-1 感染によって誘導される DSB 及び潜伏感染細胞の再活性化機構を調べた。X-線照射によるウイルス感染効率、DSB サイトとゲノム DNA の挿入過程との関係、rVpr による IL-6 産生を調べた (石坂)。HIV-1 サブタイプ A・B・C・A/E・A/G 由来の Vif の APOBEC3G に対する抑制活性を検討し、その差異とその原因機序を解明する。レトロトランスポゾン LINE-1 を用いて抗レトロウイルス宿主因子 APOBEC3 について調べ、さらに HIV-1 サブタイプ間で異なる Vif の抗 APOBEC3G 活性について調べた。in vivo ポリユビキチネーションアッセイ、in vitro トランスレーション、免疫沈降法、間接蛍光抗体法、リアルタイム RT-PCR、ウイルス感染性アッセイを組み合わせた (徳永)。HIV-1 粒子タンパク質 (Gag タンパク質) と機能的相互作用する宿主因子を無細胞タンパク質合成系および化学増幅型ルミネッセンス プロキシミティー ホモジニアスアッセイを用いて同定した (梁)。

3) HIV 感染病態の解明

少量の末梢血から HIV 特異的 CTL の発現・機能解析を行う系を確立し、蛍光マイクロアレイシステムを用いて血中液性因子を検討する。血中ウイルス量の低い群と高い群、および治療群の感染者 PBMC を用いて、非特異的刺激により誘発されるサイトカインを測定した。9000 遺伝子について発現量を解析した。細胞分画の解析も行った (岩本、立川)。神経細胞障害性ならびに神経細胞の分化能の検討を行う。中枢神経系でウイルスを産生する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を行った。脳組織スライス培養実験、組織学的解析、TUNNEL 染色などを行った (小柳)。エイズ脳症におけるウイルスが神経・グリア細胞に感染することの意義を明らかにする。サル神経・グリア細胞培養系へ SIV を感染させ、抗原量、ケモカイン、サイトカイン、蛋白リン酸化等の変化を測定した (佐多)。

C. 研究結果

1) HIV 感染免疫防御機構

LTR/Nef 領域 shRNA 発現レンチウイルスを用い、慢性 HIV 感染者の Gag に対する CD4+ T 細胞増殖応答はウイルス増殖抑制により回復可能であることを示した。恒常的 IFN- γ 産生細胞を FRET により検出可能とした。siRNA の発現により DC から CD4 陽性 T 細胞への HIV 伝播を抑制した。DC から CD4 陽性 T 細胞への免疫シナプスを介した効率よい HIV 感染伝播は T 細胞の活性化が低レベルであり、R5 型 HIV-1 が増殖しやすい条件であることが明らかとなった (横田)。DC の分化培養により CD8+T 細胞を活性化させ、さらに OX40/OX40L 発現誘導を介して R5 HIV-1 増殖を抑制した。Poly I:C が DC 分化誘導因子であることを確認し、可溶性 OX40L に R5 HIV-1 の抑制効果を認めた (田中)。HIV 曝露非感染者で、HIV 抗原刺激後特異的に発現が上がる第 22 染色体の二つの遺伝子の発現調節機構を解明するため、これらを含むゲノム領域の網羅的塩基配列決定を行い、一方の遺伝子の調節領域に塩基置換の集積を見出した。HIV 曝露非感染者の持つ遺伝的特徴を、Genel イントロンにおける塩基配列多型の集積として同定した。マウス APOBEC3 はマウスレトロウイルスの複製を強く抑制した。HIV 曝露非感染者の持つ第 22 染色体領域の遺伝的特徴を、Rac2 イントロンの機能的なハプロタイプ多型として同定した (宮澤)。Primary マクロファージ、NK 細胞および NK 感受性細胞を用いて細胞間相互作用の実験系を作成し、HIV-1 感染を抑制する自然免疫応答条件を見出した。Nef が間接的に阻害する可能性を示した。K562 細胞による前処理、TLR3、4 リガンドによる感染前後の処理により HIV-1 複製を抑制した。単球系 THP-1 細胞株においても刺激による HIV-1 複製の抑制を再現した。マクロファージへの TLR3、4、の刺激によりインターフェロン β を介して HIV-1 複製が抑制された。共生菌の中に類似の効果を示すものがあつた (神奈木)。CRF01_AE 株の Gag CTL エピトープを新たに 6 箇所発見した。北タイ HIV コホート長期生存者の CTL 認識パターンを経時的に観察した。HLA 情報のある夫婦 114 組 228 名の gag シーケンスを完了した。CRF01_AE gag 遺伝子発現系の作製を試みた。CTL 免疫圧下で生じるウイルス変異

率と復帰率は逆相関した。例外的に T242 変異は変異率と復帰率のどちらも高く、高 CD4 値、低ウイルス量であり、さらに生命予後が良い傾向にあることが判明した。北タイの HIV コホート患者においてオーバーラッピングペプチドを用いて、CRF01_AE においてはこれまで報告されていない 8 箇所の CTL エピトープ領域を同定した(有吉)。HIV 粒子の成熟に伴い Gag 多量体は収縮し、Env は Env 認識抗体と共にウイルス表面から排除される可能性を示した。Core-Env の免疫により中和血清が誘導され、Env 認識抗体を産生するハイブリドーマが得られた(高橋)。

2) HIV 感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

タイランパンの HIV 感染者の性的パートナーでありながら HIV 陰性の 32 名と HIV 感染者 36 名について、ゲノムワイドスクランニングを行って遺伝子多型 1 万箇所を検討し、有意差がある多型が 12 箇所見出された。HIV-2 の TRIM5 α 感受性はヒトとカニクイサルで共通であること、報告されたヒト TRIM5 α の一塩基多型は HIV-1 感染症の病態進行に影響せず、HIV-1 感染阻害効果にも違いが認められないことが判明した。HIV-2 のカプシドタンパク質 158、178 番目のアミノ酸変異はヒト TRIM5 α 感受性に影響した。TRIM5 α の Gly110Arg の変異は抗 HIV 作用を減弱させ、G176del は野生型 TRIM5 α の同時発現下に増強させた。(塩田)。HIV-1 陽性 52 症例中 20 例の血漿中に数 ng/ml の Vpr を検出した。Vpr 検出とウイルス価の間には正の相関が認められた。1 nM のリコンビナント Vpr を培養系に添加すると DSB が誘導され、C 末端 12 個のアミノ酸を欠失させると DSB 誘導能は激減した。また潜伏感染細胞である U1 細胞に対してウイルス産生を誘導しなかった。ウイルスインテグレーションの過程で DSB と DSB 誘発細胞内シグナルの関与が示唆された。一方、再活性化に関与する IL-6 産生では自然免疫シグナル受容体が重要な役割を担っていた。X-線照射によってウイルス感染効率は上昇、DSB サイトへウイルス DNA は挿入された。TLR4 のノックダウンで rVpr 誘発 IL-6 産生が阻害された(石坂)。HIV-1 サブタイプ間で Vif 蛋白の抗 A3G 活性の

違いが認められた。Vif の抗 A3G 活性の強弱は、G \rightarrow A 変異出現頻度と完全に逆相関することが分かった。抗 A3G 活性の違いは Vif の A3G プロテアソーム分解能の違いに起因することが明らかになった。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。サブタイプ C の Vif が、最も強い抗 APOBEC3G 活性を有し、N 末の 8 番目と 17 番目のアミノ酸によって規定されていた。B-Vif、C-Vif のユビキチン化に差はなく APOBEC3G の翻訳に影響しなかった。C-Vif の抗 APOBEC3G 活性は結合親和性の強さによって規定された(徳永)。粒子形成に関与する新規の宿主因子として BCA2/Rabring7 を同定した(梁)。

3) HIV 感染病態の解明

HIV 感染者血漿中の IP-10 が血中 HIV 量と相関することが明らかになった。少数の細胞で遺伝子発現を解析するシステムを考案した。血中ウイルス量が高い群で 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。治療開始後 1-2 ヶ月で、MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES 産生能が回復していた。高、低 HIV 群で 100 遺伝子に有意差が見られた(岩本、立川)。HIV 感染マクロファージにより神経組織内の細胞間配位に障害が起こることがわかった。神経細胞分化障害としてラメリポディア形成には異常はないが、樹状突起の成長と軸索突起の極性決定過程が障害された。微量 Vpr がマクロファージより放出され、神経細胞分化を抑制した。ミトコンドリア透過膜保護薬 ubiquinone-10 は細胞分化を改善した。HIV 誘導神経組織障害領域を同定し、HIV 誘導神経組織再生不全を明かした(小柳)。神経・グリア細胞に HIV 遺伝子が組み込まれ、SIV 由来蛋白が発現するとその細胞ないし、周囲の細胞がアポトーシスをおこす可能性が示唆された。サル神経・グリア・ミクログリア培養細胞系で HIV 感染により、ERK が活性化し、リン酸化 P53 が蓄積した(佐多)。

D. 考察

1) HIV 感染免疫防御機構

HIV 増殖抑制性 shRNA 発現レンチウイルスにより慢性感染者の Gag 特異的 CD4⁺T 細胞増

殖応答が回復したことは、体内（細胞内）HIVの増殖抑制がエイズの治療上重要であることを示唆する。FRETを用いた臨床検体への応用は感度上、現状では困難である。DC、CD4陽性T細胞などにおけるsiRNAの発現は有効である。CD4陽性T細胞のみならずDCにもHIV感染抵抗性を賦与することにより、HIV特異的CD4陽性記憶T細胞の活性化に伴うHIV増殖を制御しつつワクチンによる抗HIV免疫応答を強化することの重要性が再確認された（横田）。ヒト単球をIFN-betaとIL-4で培養すると、IL-10産生Treg誘導性DCへと分化することは新たな発見であるが、さらに研究が必要である。LPSに比べPoly I:CはHLA-DRとCD86を高く発現させる点がユニークでありDCの分化培養法として有用である（田中）。遺伝子発現の調節が感染抵抗性に関与すると考えられる。Gene1の機能的イントロン多型同定により感染抵抗性の分子メカニズムが解明された。マウスAPOBEC3アイソフォームの構造比較により、HIV複製抑制能を持ったヒト型APOBEC3を設計することが可能となった。Rac2転写制御因子が感染抵抗性を左右する可能性があり、マウスAPOBEC3に結合する因子はHIV-1複製抑制薬の開発につながる可能性がある（宮澤）。Nefが初感染時の自然免疫応答を抑制することによりHIV-1複製を有利にしていることを示唆した。マクロファージにおけるHIV-1複製抑制物質のスクリーニングが可能となった。TLR3、4の刺激に類似した複製抑制効果が共生菌の中に認められ、HIV-1感染抵抗性の宿主環境形成への応用が示唆される（神奈木）。CTL誘導型ワクチンに組み込まれるべき抗原デザインに有用な情報が得られた。エイズ進行遅延型に関係するCTLとウイルスとの関係が明らかになりつつあり、効果的なワクチン開発に向けて進行している。（有吉）。HIV-1粒子の成熟には抗体による認識回避機構が含まれている可能性がある。HIV-1 Core-Envは広域中和抗体の誘導に有効である可能性がある（高橋）。

2) HIV感染に関わる自然免疫等の宿主因子の解析

1万箇所以上の多型を同時に比較しているため、より大規模な集団で検討し直す必要がある。

HIV-2の株間におけるヒトTRIM5αに対する感受性の違いは、病態進行速度に影響する。ヒトTRIM5α多型に関する報告の信憑性は疑われる。HIV-2カプシドタンパク質の変異はヒトTRIM5α感受性を変化させることによりHIV-2増殖に影響する。ヒトTRIM5αの遺伝子多型Gly110ArgはHIV-1感染感受性を上昇させ、G176delは逆に感染抵抗性を付与する可能性が考えられた。（塩田）。Vprが積極的にエイズ病態に関与していることが示唆された。DSBサイトにウイルスDNAが挿入される可能性及び、再活性化においてVprがToll-like受容体を標的としている可能性が示唆された。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、DSB誘発細胞内シグナルが「正」の因子として作用していた。潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導に関するIL-6産生は活性酸素産生と自然免疫シグナルに関与する受容体の機能が重要な役割を担っていることが示唆された（石坂）。サブタイプによる伝播効率の違いにA3G活性の違いが関係している可能性が推察された。全てのAPOBEC3ファミリーが抗LIN-1転移活性を有していたことから、プロトタイプとしての活性を維持している可能性がある。サブタイプC Vifが高い抗APOBEC3G活性を有するのは、プロテオソームへ持ち込む能力が高いことに起因すると推察した。C-Vifの抗APOBEC3G活性は結合親和性により規定され、核局在性との相関性が示唆された。APOBEC3Fの機能的役割は低いと考えられた（徳永）。BCA2は新規のtetherin結合タンパク質であり、重要なrestriction factorである可能性が高い（梁）。

3) HIV感染病態の解明

さらに解明を進めるために少量の血液から遺伝子発現のマイクロアレイ解析を大幅に拡張できるシステムに移行する必要がある。MIP-1α、MIP-1β、RANTESはR5-HIVの感染阻害因子であると同時にTh1の遊走因子であり、セットポイントを規定する要因である可能性がある。HIV量が低下するとMIP-1α、MIP-1β、RANTES産生は回復する。高、低HIV群の差はMIP-1α、MIP-1β、RANTES産生細胞の質的異常によるものであると考えた（岩本、立川）。HIVのVprが神経細胞軸索伸長阻害因子とな

りかつミトコンドリアの機能低下が伴っていることから、この機能を改善することが治療に関わるかもしれない。ubiquinone-10 は広く臨床の場で使用されている薬剤であることから、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高い。脳組織スライス培養は HIV 誘導神経系障害の評価系として応用可能であり、神経破壊と再生不全の蓄積の結果、HIV 感染による中枢神経障害が誘発されていると考えた（小柳）。神経・グリア細胞に潜伏感染している SIV は神経・グリア細胞障害に関与することが示唆された。SIV 感染によって神経・グリア細胞培養系および神経・グリア・ミクログリア細胞培養系の細胞で持続的に ERK が活性化し、リン酸化 p53 が蓄積すると考えられた（佐多）。

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

E. 結論

HIV 感染免疫防御機構における Gag 特異的 CD4+T 細胞の役割、DC から T 細胞への HIV 感染伝播の阻害法、DC の分化誘導法、自然感染抵抗性を示す遺伝要因、自然免疫を抑制する HIV-1 因子とその利用法、感染患者における CTL 免疫とウイルスの関係、中和抗体の誘導抗原について知見が得られた。HIV の感染感受性を決定し、ウイルスの変異をもたらす宿主因子、Vpr 蛋白の複製への関与、Vif 蛋白の活性分子機構について説明がなされた。粒子形成に関与する宿主因子を同定した。HIV 感染病態の解明では、種々のサイトカインの発現や、エイズ脳症の発症に関わる病態が明らかにされた。

F. 健康危険情報

各分担者の報告書参照。

G. 研究発表

1. 論文発表

各分担者の報告書参照。

2. 学会発表

各分担者の報告書参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

各分担者の報告書参照。

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果に関する刊行一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kubo M, Nishitsuji H, Kurihara K, Hayashi T, Masuda T, Kannagi M	Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by arginine deiminase of <i>Mycoplasma arginini</i> .	J Gen Virol	87	1589-1593	2006
Iwata N, Yoshida H, Tobiume M, Ono F, Shimazaki T, Sata T, Nakajima N.	Simian fetal brain progenitor cells for studying viral neuropathogenesis.	J Neurovirol	13	11-22	2007
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	23	686-692	2007
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
Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S, Ishizaka Y	Vpr in plasma of HIV type 1-positive patients is correlated with the HIV type 1 RNA titers .	AIDS Res Hum Retroviruses	23	391-397	2007
Takahashi Y, Tanaka R, Yamamoto N, Tanaka Y	Enhancement of OX40-induced apoptosis by TNF co-activation in OX40-expressing T cell lines in vitro leading to decreased targets for HIV-1 production.	AIDS Res Hum Retroviruses	24	423-35	2008
Takeda E, Tsuji-Kawahara S, Sakamoto M, Langlois MA, Neuberger MS, Rada C, Miyazawa M	Mouse APOBEC3 restricts friend leukemia virus infection and pathogenesis in vivo.	J Virol	82	10998-11008	2008

Kono K, Song H, Shingai Y, Shioda T, Nakayama EE	Comparison of anti-viral activity of rhesus monkey and cynomolgus monkey TRIM5alphas against human immunodeficiency virus type 2 infection.	Virology	373	447-456	2008
Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N	SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking and stability of HIV-1 Gag.	Proc Natl Acad Sci U S A	105	294-299	2008
Kitayama H, Miura Y, Ando Y, Hoshino S, Ishizaka Y, Koyanagi Y	Human immunodeficiency virus type 1 Vpr inhibits axonal outgrowth through induction of mitochondrial dysfunction.	J Virol	82	2528-2542	2008
Mizukoshi F, Yamamoto T, Mitsuki YY, Terahara K, Kawana-Tachikawa A, Kobayashi K, Iwamoto A, Morikawa Y, Tsunetsugu-Yokota Y	Activation of HIV-1 Gag-specific CD8(+) T cells by yeast-derived VLP-pulsed dendritic cells is influenced by the level of mannose on the VLP antigen.	Microbes Infect		in press	2009
Miyazaki E, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Nunoya J, Odawara T, Fujii T, Shi Y, Gao FG, Iwamoto A	Highly restricted TCR repertoire in the CD8+ T-cell response against an HIV-1 epitope with a stereotypic amino acid substitution.	AIDS		in press	2009
Takahashi H, Kitagawa Y, Maeda-Satoh M, Hasegawa H, Sawa H, Sata T	Monoclonal Antibody and siRNAs for Topoisomerase I Suppress Telomerase Activity.	Hybridoma (Larchmt)		in press	2009

Short
CommunicationSuppression of human immunodeficiency virus
type 1 replication by arginine deiminase of
*Mycoplasma arginini*Makoto Kubo,^{1,2} Hironori Nishitsuji,¹ Kiyoshi Kurihara,¹ Takaya Hayashi,¹
Takao Masuda¹ and Mari Kannagi¹Correspondence
Mari Kannagi
kann.impt@tmd.ac.jp¹Department of Immunotherapeutics, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University,
1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan²Japanese Foundation for AIDS Prevention, Tokyo 105-0001, Japan

It was found previously that human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-irrelevant CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) from uninfected donors suppressed HIV-1 replication in a cell-contact-dependent manner. However, one of these CTL lines (CTL-3) also significantly suppressed HIV-1 replication through its supernatant. Here, the suppressive fraction from CTL-3 supernatant was purified and analysed by mass spectrometry. A protein band specific for the suppressive fraction was identified as arginine deiminase from *Mycoplasma arginini*, which catalyses the hydrolysis of arginine to citrulline. Addition of L-arginine or the use of antibiotics against mycoplasma restored supernatant-mediated but not cell-contact-dependent suppression of HIV-1 replication by CTL-3, clearly indicating that arginine deiminase of *M. arginini* in the supernatants suppressed HIV-1 replication, which is independent of CD8⁺ T-cell-mediated HIV-1 suppression via cell contact. Arginine deiminase is known to be a chemotherapeutic agent against arginine-requiring tumours and these results suggest that it also has potential application in antiviral therapy.

Received 21 September 2005
Accepted 31 January 2006

CD8⁺ cells including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) play important roles in controlling HIV-1 infection (Borrow *et al.*, 1994; McMichael & Rowland-Jones, 2001). It has been shown that CD8⁺ cells of asymptomatic carriers produce an unknown CD8⁺ T-cell antiviral factor that can suppress HIV-1 replication at a transcriptional level without causing cell death (Mackewicz *et al.*, 1995).

We have demonstrated previously that anti-HIV-1 activities of CD8⁺ cells of asymptomatic carriers exhibit both major histocompatibility complex (MHC) I-restricted and -unrestricted suppression (Kannagi *et al.*, 1990; Ohashi *et al.*, 1999), and that HIV-1-irrelevant CD8⁺ CTLs derived from uninfected donors also inhibit X4 and R5 HIV-1 replication (Liu *et al.*, 2003). Therefore, we hypothesized that MHC I-unrestricted suppression of HIV-1 replication might be a common property of CD8⁺ CTLs, regardless of HIV-1 infection in the host. However, in our system, such CD8⁺ cell-mediated suppression required direct contact between CD8⁺ cells and infected cells.

Whilst investigating CD8⁺ cell-mediated HIV-1 suppression, we established four allo-specific CD8⁺ CTL lines, CTL-1 (Liu *et al.*, 2003), CTL-2, CTL-3 and CTL-4, from four uninfected healthy donors by stimulating peripheral

blood mononuclear cells with mitomycin C (MMC)-treated Raji (Pulvertaft, 1964) cells in a long-term culture in the presence of recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) as described previously (Liu *et al.*, 2003). These CTLs were not cytotoxic to autologous CD4⁺ cells, but significantly suppressed HIV-1 replication in HIV-1-infected autologous CD4⁺ cells when directly co-cultured.

Among these CTL lines, we found that culture supernatants of CTL-3 suppressed HIV-1 replication in addition to cell-mediated suppression. In the present study, we purified and identified the suppressive factor in the supernatant of CTL-3 by serial high-performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry.

Fig. 1 shows representative data of HIV-1 suppression by the established allo-specific CD8⁺ CTL lines. CTLs from both the CTL-2 and CTL-3 lines markedly suppressed HIV-1 replication when directly co-cultured with HIV-1-infected autologous CD4⁺ cells, whereas culture supernatants from CTL-3 but not CTL-2 suppressed HIV-1 replication (Fig. 1a). Culture supernatants of CTL-3 suppressed replication of both X4 HIV-1 strain NL4-3 (Adachi *et al.*, 1986) and R5 HIV-1 strain JR-CSF (Koyanagi *et al.*, 1987) (Fig. 1b). CTL-2 and CTL-3 culture supernatants did not alter the viability of CD4⁺ T cells during 4 days of culture.

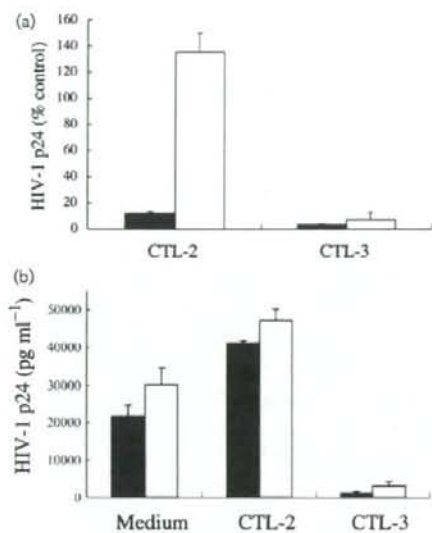
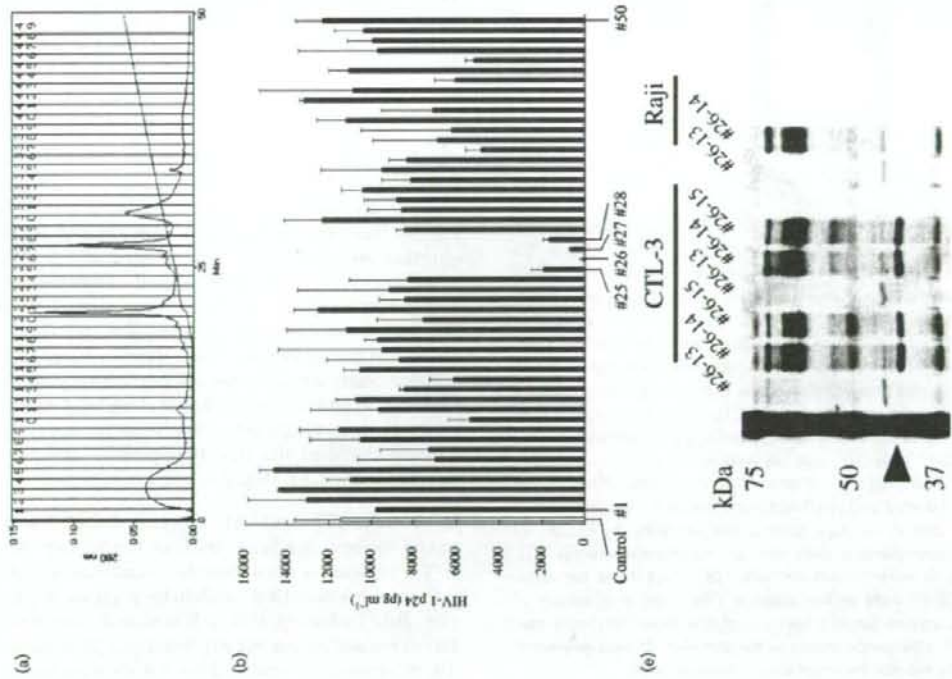
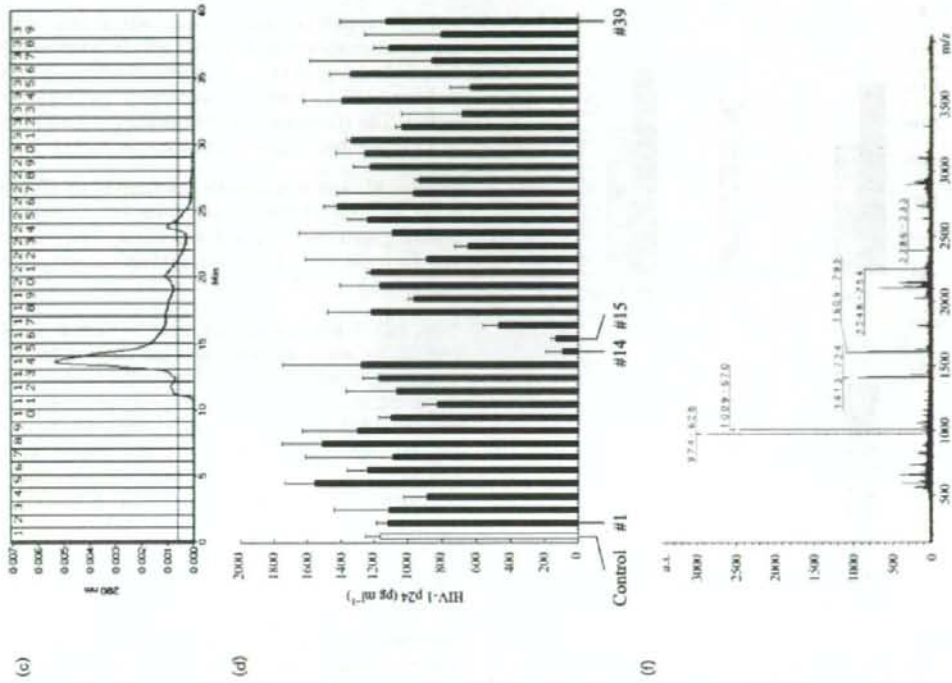


Fig. 1. Cell- and soluble factor-mediated suppression of HIV-1 replication by CD8⁺ CTLs. (a) Cells (3×10^5 cells per well) (filled bar) or culture supernatants (50% vol.) (open bar) of two allo-specific CD8⁺ CTL lines (CTL-2 and -3) established from two uninfected donors were co-cultured with phytohaemagglutinin-stimulated autologous CD4⁺ cells (10^5 cells per well) infected with HIV-1 NL4-3 for 2 h *in vitro*. After culturing for 4 days, the amount of HIV-1 p24 in the supernatants was measured by ELISA (Cellular Products). The results indicate the amounts of HIV-1 p24 (%) compared with infected CD4⁺ cells alone. The CTL culture supernatants used were prepared as fetal bovine serum (FBS) free and supplemented with 10% FBS for use. To prepare FBS-free supernatants, CTLs were washed 24 h after stimulation with MMC-treated Raji cells and the supernatants were harvested following another 48 h of culture at a concentration of 5×10^6 cells ml⁻¹ in FBS-free RPMI 1640 in the presence of 50 U rhIL-2 ml⁻¹. The supernatants were passed through 0.22 μ m filters before use. (b) Similarly prepared culture supernatants of CTL-2 and -3 were added at 50% concentrations into acutely HIV-1 NL4-3 (filled bar)- or JR-CSF (open bar)-infected CD4⁺ cell cultures for 4 days and the amount of HIV-1 p24 in the supernatants was measured by ELISA. The results indicate the mean \pm SD of duplicate wells. Similar results were obtained when CTL supernatants prepared in the presence of FBS were used. The viability of CD4⁺ T cells after 4 days of culture with medium or with CTL-2 and CTL-3 culture supernatants was 95.37 ± 0.13 , 97.84 ± 0.15 and 98.64 ± 0.08 %, respectively, as determined by flow cytometry following staining with fluorescein isothiocyanate-annexin V and 7-aminoactinomycin D.

In order to purify the suppressive factor(s), first we separated the CTL-3 culture supernatant on an anion-exchange UNO-Q1 column (Bio-Rad) with a linear gradient from 0 to 1.0 M NaCl in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) using HPLC (Fig. 2a). The HIV-1 suppressive

Fig. 2. Purification and identification of an HIV-1 suppressive factor in CTL-3 culture supernatants by HPLC. (a) FBS-free culture supernatants of CTL-3 prepared as described in Fig. 1 legend were concentrated with Amicon Ultra-4 (Millipore), applied to an anion-exchange column (UNO-Q1; Bio-Rad) and eluted with a linear gradient (0–1.0 M NaCl) in 10 mM potassium phosphate buffer at a flow rate of 1 ml min⁻¹ using an HPLC system (BioCAD; Applied Biosystems). Protein peaks, conductivity and fraction numbers are indicated. (b) Each fraction was dialysed against PBS, cleared through a 0.22 μ m filter, supplemented with 10% FBS and added to an HIV-1 NL4-3-infected CD4⁺ cell culture at a concentration of 50%. The same volume of PBS with 10% FBS was used as a control (open bar). After 4 days of incubation, the amount of HIV-1 p24 in the culture supernatants was measured by ELISA. The results indicate the mean \pm SD of duplicate wells. (c) Fraction #26 separated by anion-exchange HPLC was further subjected to gel filtration on a TSK gel 2000 column (Tosoh) using HPLC at a flow rate of 0.5 ml min⁻¹ in PBS. Protein peaks, conductivity and fraction numbers are indicated. (d) Each gel-filtrated HPLC fraction was evaluated for HIV-1 suppressive activity as described in (b). (e) Fractions #26–13, -14 and -15, separated as described in (c) from two independently prepared samples, were subjected to 7.5% SDS-PAGE at a constant current of 24 mA per gel for 5 h. The proteins were visualized by silver staining (ProteoSilver Plus Silver Stain kit; Sigma-Aldrich). Similarly purified fractions from culture supernatants containing MMC-treated Raji cells alone served as controls. The arrow at 45 kDa indicates the bands specific for the fractions with HIV-1 suppressive activity. (f) The protein band at 45 kDa was excised from the SDS-polyacrylamide gel, digested with lysyl endopeptidase and subjected to MALDI-TOF-MS using an Ultraflex TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) as described previously (Yamagata *et al.*, 2002). The MS spectrum of this protein as shown was analysed by MASCOT software (Matrix Science) with the NCBInr database and identified as arginine deiminase from *M. arginini*.



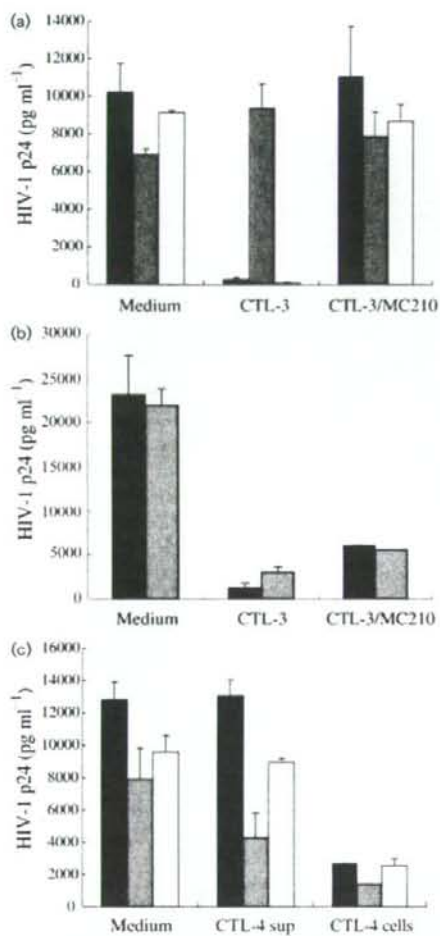


Fig. 3. L-Arginine and MC210 restore the supernatant- but not cell-mediated suppression of HIV-1 replication by CTL-3. (a) Culture supernatants from CTL-3 cells and CTL-3 cells treated with an antibiotic against mycoplasma (MC210; Dainippon Pharmaceutical) for 2 weeks (CTL-3/MC210) were added to an acutely HIV-1 NL4-3-infected CD4⁺ cell culture in the absence (filled bar) or presence of 10 mM L-arginine (shaded bar) or L-glycine (open bar). HIV-1 p24 concentration in the supernatants was measured by ELISA 4 days after infection. (b) CTL-3 or CTL-3/MC210 cells were directly co-cultured with phytohaemagglutinin-stimulated autologous CD4⁺ cells (10⁵ cells per well) acutely infected with HIV-1 NL4-3 at a CTL:CD4⁺ cell ratio of 3 in the absence (filled bar) or presence (shaded bar) of 10 mM L-arginine for 4 days. The amount of HIV-1 p24 in the supernatants was measured by ELISA. (c) Culture supernatants or cells from another mycoplasma-free CTL line (CTL-4) were co-cultured with HIV-1 NL4-3-infected autologous CD4⁺ cells in the absence (filled bar) or presence of 10 mM L-arginine (shaded bar) or L-glycine (open bar) for 4 days and HIV-1 p24 concentration in the supernatants was measured. The results indicate the mean \pm SD of duplicate wells.

activity of each fraction (1 ml) was evaluated following direct co-culture with CD4⁺ cells infected with HIV-1 NL4-3. As shown in Fig. 2(b), fractions #25 to #28 of anion-exchange HPLC markedly suppressed the replication of HIV-1. The suppressive activity peaked at fraction #26 in more than three independent experiments.

Fraction #26 was subsequently separated by gel filtration on a TSK gel 2000 column (Tosoh) using HPLC (Fig. 2c). The resulting fractions, #14 and #15 (designated #26-14 and #26-15, respectively, hereafter) markedly suppressed HIV-1 replication (Fig. 2d).

Next, HIV-1-suppressive fractions #26-14 and -15, serially purified by anion-exchange and gel-filtrated HPLC from CTL-3 supernatants, were resolved by 7.5% SDS-PAGE. As a control, similarly purified fractions from culture supernatants of MMC-treated Raji cells were used. As shown in Fig. 2(e), silver staining showed protein bands at 45 kDa that were observed only in #26-14 and -15, and not in the control fractions. The 45 kDa protein bands were cut from a separately prepared negatively stained gel (Wako) and subjected to matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).

Fig. 2(f) demonstrates the MS spectrum of peptides extracted from the 45 kDa band after digestion with lysyl endopeptidase, obtained using an Ultraflex TOF/TOF mass spectrometer (Kristensen *et al.*, 2000; Yamagata *et al.*, 2002). Several peaks were analysed further by MS/MS (data not shown). Computer analysis of the MS and MS/MS spectra using MASCOT software (Matrix Science) with the NCBI database identified the protein as arginine deiminase from *Mycoplasma arginini*. The results strongly indicated that the CTL-3 cells had been contaminated by *M. arginini*, although growth of the CTL-3 cells was not affected.

Finally, we examined whether the suppressive effects of CTL-3 supernatants on HIV-1 replication were attributed to arginine deiminase. Arginine deiminase is a mycoplasma enzyme that catalyses the imine hydrolysis of arginine to citrulline and ammonia. When L-arginine (10 mM) was added to an HIV-1-infected CD4⁺ cell culture together with CTL-3 culture supernatant, the suppression of HIV-1 replication was almost completely restored (Fig. 3a), clearly indicating that the suppressive effects were mediated mostly by arginine deiminase. L-Glycine (10 mM) as a control showed no effect. In addition, treatment of the CTL-3 culture with antibiotic MC210 against mycoplasma for approximately 2 weeks abolished the HIV-1-suppressive activity of the culture supernatants (Fig. 3a).

In contrast, CTL-3 and MC210-treated CTL-3 cells continued to show significant levels of suppressive effects on HIV-1 replication when directly co-cultured with HIV-1-infected autologous CD4⁺ cells in the presence of L-arginine (Fig. 3b), indicating that cell-mediated suppression of HIV-1 replication was not attributed to arginine deiminase. The presence of cell-mediated but not supernatant-mediated

suppressive effects on HIV-1 replication was also confirmed by using another mycoplasma-free CD8⁺ CTL line (CTL-4) (Fig. 3c).

Our results clearly indicate that arginine deiminase from *M. arginini* suppresses HIV-1 replication in CD4⁺ cells *in vitro*. Although arginine is a non-essential amino acid for humans and mice, some cancers have an elevated requirement for arginine. Arginine deiminase inhibits the growth of arginine-requiring tumours such as human melanomas and hepatocellular carcinoma *in vitro* and *in vivo*, suggesting its potential use as a chemotherapeutic reagent (Curley *et al.*, 2003; Ensor *et al.*, 2002).

Mycoplasma contamination of HIV-1-infected culture causes various effects *in vitro*, such as enhancement of the cytopathic effects associated with HIV-1 replication (Lo *et al.*, 1991), inhibition of CD4 expression and gp120 binding (O'Toole & Lowdell, 1990) and apparent reduction of reverse transcriptase activity, probably due to nuclease activity (el-Farrash *et al.*, 1994; Shang *et al.*, 1995; Vasudevachari *et al.*, 1990). *Mycoplasma penetrans* isolated from HIV-1-infected individuals potentially activates T lymphocytes and HIV-1 replication, suggesting its contribution to disease progression (Sasaki *et al.*, 1995). This variety of effects might partly be due to the variety of *Mycoplasma* species.

In the present study, we identified arginine deiminase as a suppressive factor of HIV-1 replication. Although we found it in a CD8⁺ CTL line possessing HIV-1-suppressive activity, only supernatant-mediated and not cell-contact-dependent suppression of HIV-1 was attributed to arginine deiminase. The precise mechanisms of arginine deiminase-mediated inhibition of the HIV-1 replication cycle remain to be clarified.

Acknowledgements

We thank ProPhoenix Co. Ltd (Higashi-Hiroshima, Japan) for analysis of protein bands by MALDI-TOF-MS. This work was supported by grants from the Ministry of Health, Welfare and Labor, Japan.

References

Adachi, A., Gendelman, H. E., Koenig, S., Folks, T., Willey, R., Rabson, A. & Martin, M. A. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J Virol* 59, 284–291.

Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M. & Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68, 6103–6110.

Curley, S. A., Bomalaski, J. S., Ensor, C. M., Holtsberg, F. W. & Clark, M. A. (2003). Regression of hepatocellular cancer in a patient treated with arginine deiminase. *Hepatology* 50, 1214–1216.

el-Farrash, M. A., Kannagi, M., Kuroda, M. J., Yoshida, T. & Harada, S. (1994). The mycoplasma-related inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase has a DNase activity and is present in the particle-free supernatants of contaminated cultures. *J Virol Methods* 47, 73–82.

Ensor, C. M., Holtsberg, F. W., Bomalaski, J. S. & Clark, M. A. (2002). Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG_{20,000} mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res* 62, 5443–5450.

Kannagi, M., Masuda, T., Hattori, T., Kanoh, T., Nasu, K., Yamamoto, N. & Harada, S. (1990). Interference with human immunodeficiency virus (HIV) replication by CD8⁺ T cells in peripheral blood leukocytes of asymptomatic HIV carriers *in vitro*. *J Virol* 64, 3399–3406.

Koyanagi, Y., Miles, S., Mitsuyasu, R. T., Merrill, J. E., Vinters, H. V. & Chen, I. S. (1987). Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms. *Science* 236, 819–822.

Kristensen, D. B., Imamura, K., Miyamoto, Y. & Yoshizato, K. (2000). Mass spectrometric approaches for the characterization of proteins on a hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer. *Electrophoresis* 21, 430–439.

Liu, H., Ohashi, T., Masuda, T., Zhou, X., Kubo, M. & Kannagi, M. (2003). Suppression of HIV-1 replication by HIV-1-irrelevant CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes resulting in preservation of persistently HIV-1-infected cells *in vitro*. *Viral Immunol* 16, 381–393.

Lo, S. C., Tsai, S., Benish, J. R., Shih, J. W., Wear, D. J. & Wong, D. M. (1991). Enhancement of HIV-1 cytopathic effects in CD4⁺ lymphocytes by the AIDS-associated mycoplasma. *Science* 251, 1074–1076.

Mackewicz, C. E., Blackburn, D. J. & Levy, J. A. (1995). CD8⁺ T cells suppress human immunodeficiency virus replication by inhibiting viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2308–2312.

McMichael, A. J. & Rowland-Jones, S. L. (2001). Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410, 980–987.

Ohashi, T., Kubo, M., Kato, H., Iwamoto, A., Takahashi, H., Fujii, M. & Kannagi, M. (1999). Role of class I major histocompatibility complex-restricted and -unrestricted suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8⁺ T lymphocytes. *J Gen Virol* 80, 209–216.

O'Toole, C. & Lowdell, M. (1990). Infection of human T cells with mycoplasma, inhibition of CD4 expression and HIV-1 gp120 glycoprotein binding, and infectivity. *Lancet* 336, 1067.

Pulvertaft, J. V. (1964). Cytology of Burkitt's tumour (African Lymphoma). *Lancet* 283, 238–240.

Sasaki, Y., Blanchard, A., Watson, H. L., Garcia, S., Dulioust, A., Montagnier, L. & Gougeon, M. L. (1995). *In vitro* influence of *Mycoplasma penetrans* on activation of peripheral T lymphocytes from healthy donors or human immunodeficiency virus-infected individuals. *Infect Immun* 63, 4277–4283.

Shang, H., Miyakawa, Y., Sasaki, T., Nakashima, H. & Ito, M. (1995). Suppression of HIV-1 reverse transcriptase activity by culture supernatants of mycoplasmas. *Microbiol Immunol* 39, 987–993.

Vasudevachari, M. B., Mast, T. C. & Salzman, N. P. (1990). Suppression of HIV-1 reverse transcriptase activity by mycoplasma contamination of cell cultures. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6, 411–416.

Yamagata, A., Kristensen, D. B., Takeda, Y., Miyamoto, Y., Okada, K., Imamoto, M. & Yoshizato, K. (2002). Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. *Proteomics* 2, 1267–1276.