

分担研究報告書

サル類に感染性・病原性を示す HIV-1 クローンの構築

研究分担者 足立昭夫 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 教授  
研究協力者 野間口雅子 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授

**研究要旨** HIV-1 感染・発症霊長類モデルを確立することを目標に、サル細胞での複製・増殖に適化した HIV-1 クローンの分子構築を試みた。試験管内の遺伝子工学的改変およびカニクイザルやアカゲザル細胞におけるウイルス馴化を適宜組み合わせることにより、サル病原性標準株である SIVmac239 と同程度の増殖能（サル株化細胞）を示す HIV-1 の構築に成功した（MN4Rh-3 および MN5Rh-3）。プロトタイプのサル指向性 HIV-1 に比較すると、MN4Rh-3（X4 ウイルス）と MN5Rh-3（R5 ウイルス）は Gag-CA（ヘリックス 4/5 および 6/7 ループを SIVmac239 型に置換し、さらに、増殖適応変異に基づき 1 アミノ酸を置換）、Pol-IN（増殖適応変異）および Env-SU（増殖適応変異）が改変されている。MN4Rh-3 はカニクイザル TRIM5 $\alpha$  に対して抵抗性であるが、アカゲザル TRIM5 $\alpha$  による抑制は回避できない。

**A. 研究目的**

我々が世界に先駆けて構築したプロトタイプサル指向性 HIV-1 (NL-DT5R) は SIVmac239 の *vif* 遺伝子全部と *gag* 遺伝子のごく一部（CA ヘリックス 4/5 ループをコードする領域）とを持つ。NL-DT5R は種々のサル細胞（カニクイザル由来 HSC-F 細胞、アカゲザル由来 HSR5.4 細胞、ブタオザル、アカゲザルおよびカニクイザル由来末梢血単核細胞（PBMC））だけでなく、ブタオザルやカニクイザル個体にも感染・増殖できる（PNAS 103:16959-16964, 2006; J Virol 81:11549-11552, 2007; Rev Med Virol 18:261-275, 2008; 未発表データ）。しかしながら、NL-DT5R はサル病原性標準株である SIVmac239 よりサル細胞での増殖効率が悪く（PNAS 103:16959-16964, 2006）、また、ブタオザルやカニクイザル感染個体でのウイルス血症も一過性であった（J Virol 81:11549-11552, 2007; 未発表データ）。

本年度は、HIV-1/マカクザル感染・発症システムの構築を目指し、カニクイザルやアカゲザル細胞での増殖に最適化したウイルスの作製を試みた。

**B. 研究方法**

1. サル指向性 HIV-1 の改変。細胞馴化による適応変異と構造解析に基づく試験管内改変とを適宜組み合わせ、サル細胞での増殖能を指標にウイルスゲノムの改良を行なった。トランスフェクションにはヒト 293T 細胞を用い、リン酸カルシウム法で行なった。ウイルス量は培養上清中の逆転写酵素 (RT) 活性により測定した。標的サル細胞にはカニクイザル由来 HSC-F 及びアカゲザル由来 HSR5.4 を使用した。ウイルスゲノムは感染細胞より PCR 法で分子クローンした (PNAS 103:16959-16964, 2006)。その

他、種々の分子ウイルス学的及び遺伝子工学的手法は定法に従った。

2. ウイルスゲノムのシーケンシング。アプライドバイオシステムのサイクルシーケンスキットを用いて決定した。
3. 抗サル TRIM5 $\alpha$ 活性の測定。カニクイザルおよびアカゲザルサルの TRIM5 $\alpha$ を PCR 法で分子クローンし、これらを恒常的に発現するネコ CRFK 細胞を樹立した。これらの細胞に対するウイルス感染価を VSV-G シュードタイプウイルスを用いるルシフェラーゼアッセイで定量した。

(倫理面への配慮)

本研究では、動物実験あるいはヒト材料を用いた実験は行っていない。

### C. 研究結果

1. プロトタイプサル指向性 HIV-1 感染サル細胞の長期培養により得られた増殖適応変異 (Gag-CA、Pol-IN および Env-SU) とそれらの構造解析等から予測された増殖能向上変異 (Gag-CA) を全て持つウイルスを分子構築した (感染症研究所/佐藤裕徳室長らとの共同研究)。最終的に得られた MN4Rh-3 (X4 ウイルス) および MN5Rh-3 (R5 ウイルス) は HSC-F 細胞と HSR5.4 細胞において SIVmac239 と同等以上に効率良く増殖した。MN4Rh-3 はカニクイザル PBMC においても、カニクイザル個体に持続感染可能な旧版のウイルスクローンよりはるかに良く増殖した (京都大学/明里宏文教授らとの共同研究)。しかし、MN4Rh-3 でさえもアカゲザル PBMC ではほとんど増殖できなかった (京都大学/明里宏文教授らとの共同研究)。
2. 上記の結果を受け、CRFK/TRIM 細胞を用いて MN4Rh-3 の抗サル TRIM5 $\alpha$ 活性を検証した。ヘリックス 4/5 および 6/7 ループを SIVmac239 型に置換した Gag-CA を持つウイルスは (MN4Rh-3 を含む) 効率良くカニクイザル TRIM5 $\alpha$ を抑制した。これに対し、アカゲザル TRIM5 $\alpha$  (*mamu-3* および *mamu-4*)

の抑制は充分回避できなかった。

### D. 考察

HIV-1 の基礎・臨床研究を進展させるためには、SIV や SHIV ではなく HIV-1 そのものを用いたサル感染・発症モデルが必要である。このシステムが確立できれば、長い間不可能であった (1) HIV-1 の個体内複製機構や病原性発現機構の解析、(2) 分子・細胞レベルでは不明の点の多い HIV-1 アクセサリー蛋白質の個体内機能の解析、(3) HIV-1 感染症の制御に繋がる新薬/ワクチンの評価・開発研究 が実現可能となる。本研究で得られた HIV-1 の分子クローン (MN4Rh-3 および MN5Rh-3) はこれらの目標に向け極めて有望である。これまでの成果を総合すれば、MN4Rh-3 はカニクイザル感染急性期における薬剤評価のためのシードウイルスとして充分使用可能である (京都大学/明里宏文教授らとの共同研究)。しかし、アカゲザル TRIM5 $\alpha$ の抗ウイルス活性を効率良く回避するウイルスは未だ得られていない。Gag-CA の構造と TRIM5 $\alpha$ や他の抗ウイルス因子との相互作用について、さらに詳細に検討していく必要がある。

### E. 結論

本研究により、プロトタイプサル指向性 HIV-1 より増殖効率等で格段に優れた分子クローンが得られ、我々の目指す「実験用霊長類に病原性を示す HIV-1 の構築」に向け大きく前進した。今後、更なるウイルスの改良に努めたい。HIV-1 感受性に関するサル種間差や個体差の分子基盤についても詳細な検討を加える予定である。また、本研究により、複製抑制がかかるサル細胞内での HIV-1 変異・適応・進化が系統的かつ実験的に解析できることも明らかになった。感染カニクイザルでのウイルスゲノムの動向についても同様な解析を試みたい。

## F. 健康危険情報

該当事項なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Nagao, T., Hatcho, K., Doi, N., Fujiwara, S., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region. *Journal of Medical Investigation* 56: 21-25.
- 2) Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, K., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2009. Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells. *Microbes and Infection* 11: 164-171.
- 3) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E.E. 2009. Modification of a loop sequence between  $\alpha$ -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) *vif* and CA  $\alpha$ -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells. *Retrovirology* 6: 70.
- 4) Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M. 2010. Role of HIV-1 Nef protein for virus replication *in vitro*. *Microbes and Infection* 12: 65-70.
- 5) Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A. 2010. Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif

determines HIV-1 infectivity. *Microbes and Infection* 12: 166-171.

- 6) Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A. 2010. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology*, in press.

### 2. 学会発表

- 1) Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., Adachi, A., Akari, H., and Nakayama, E. E. Modification of a loop between  $\alpha$ -helices 6 and 7 of virus capsid protein improves human immunodeficiency virus type 1 replication in cynomolgus monkey cells. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Sept. 10, 2009, Awaji, Japan.
- 2) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 インテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) における 1 アミノ酸変異によるウイルス増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 25 日、東京.
- 3) 土肥直哉、野間口雅子、藤原佐知、三宅在子、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の増殖適応変異の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
- 4) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 HIV-1 Env の 1 アミノ酸変異による増殖促進機構の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.
- 5) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 SIV 由来 CA h6/7 loop を持つ第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体で効率よく増殖する. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.

- |  |   |
|--|---|
| <p>6) 黒石 歩、齊藤 暁、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド <math>\alpha</math>-ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 26 日、東京.</p> <p>7) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、2009 年 10 月 27 日、東京.</p> <p>8) 三宅在子、野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、足立昭夫 HIV-1 増殖過程におけるインテグラーゼ (IN) C 末端領域 (CTD) の影響. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.</p> <p>9) 黒石 歩、齊藤 暁、新開泰宏、塩田達雄、野間口雅子、足立昭夫、明里宏文、中山英美 サル指向性 HIV-1 のサル細胞でのウイルス増殖におけるカプシド <math>\alpha</math>-ヘリックス 6-7 間のループの重要性. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.</p> <p>10) 横山 勝、大出裕高、野間口雅子、神田忠仁、足立昭夫、佐藤裕徳 HIV-1 Env V3 ループ構造の安定性を制御するアミノ酸. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 26 日、名古屋.</p> <p>11) 野間口雅子、土肥直哉、藤原佐知、三宅在子、横山 勝、大出裕高、佐藤裕徳、足立昭夫 サル細胞指向性 HIV-1 の細胞馴化による増殖適応変異の解析. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋.</p> <p>12) 齊藤 暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石 歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文 第 2 世代サル指向性 HIV-1 クローンはカニクイザル個体において効率よく増殖する. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、2009 年 11 月 28 日、名古屋.</p> | <p>1. 特許取得<br/>なし。</p> <p>2. 新案登録<br/>なし。</p> <p>3. その他<br/>なし。</p> |
|--|---|

**H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）  
分担研究報告書

サル指向性 HIV-1 感染による宿主免疫応答に関する解析

研究分担者 俣野 哲朗 東京大学医科学研究所教授

**研究要旨**

エイズ動物モデルは、HIV-1 感染増殖・エイズ発症機序の解明および抗エイズ治療薬・ワクチンの開発に重要である。現時点では、ヒトと同じように HIV-1 が持続感染しエイズ発症に至る動物モデルは存在せず、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染マカクサルモデルが最適のエイズ動物モデルと考えられている。本研究班のこれまでの研究では、カニクイサルにおいて、持続感染成立には至らないものの、一過性のウイルス血症を呈する程度の感染性を有するサル馴化型 HIV-1 が得られてきている。そこで、私どもは、このサル馴化型 HIV-1 の一過性の感染増殖により誘導される宿主免疫反応を解析することとした。平成 20 年度の第 1 世代サル馴化型 HIV-1（DT5R）感染サルへの SIV スーパーチャレンジ実験で SIV 持続感染成立が阻止されたことから、平成 21 年度は、第 2 世代サル馴化型 HIV-1（MN4-5S と MN5-10S）感染サル 4 頭への SIV スーパーチャレンジを行い、誘導される SIV 特異的細胞傷害性 T リンパ球（CTL）反応を解析した。SIV スーパーチャレンジ後、持続感染成立阻止効果については確認できなかったが、SIV 抗原特異的 CTL 反応が誘導され、特に 2 頭では第 2 世代サル馴化型 HIV-1 と SIV が共有する SIV Vif 抗原特異的 CTL 反応が強く認められた。このスーパーチャレンジ実験は、2 つのウイルスが共有する抗原が限定的であるため、その限定された抗原特異的 CTL 反応のウイルス複製抑制効果の解析に有用である可能性が考えられる。

**A. 研究目的**

エイズ動物モデルは、HIV-1 感染増殖・エイズ発症機序の解明および抗エイズ治療薬・ワクチンの開発に必要である。現時点では、ヒトと同じように HIV-1 が持続感染しエイズ発症に至る動物モデルは存在せず、サル免疫不全ウイルス（SIV）感染マカクサルモデルが最適のエイズ動物モデルと考えられている。

HIV-1 のサル細胞への感染効率はヒト細胞への感染効率より劣っており、サルでは従来の HIV-1 感染によるウイルス血症は認められない。しかし、本研究班のこれまでの研究により、カニクイサルにおいて持続感染成立には至らないものの一過

性のウイルス血症を呈する程度の感染性を有するサル馴化型 HIV-1 が得られてきている。このサル馴化型 HIV-1 研究の進展は、HIV-1 感染サルエイズモデルの開発、および持続感染に必要な機序の同定に結びつくという点で大きな意義がある。私どもは、このサル馴化型 HIV-1 の一過性の感染増殖により誘導される宿主免疫反応を解析することとした。

平成 20 年度には、第 1 世代サル馴化型 HIV-1 感染カニクイサル 2 頭の SIV スーパーチャレンジ実験により、SIV 持続感染成立阻止が観察された。そこで平成 21 年度は、第 2 世代サル馴化型 HIV-1 感染サル 4 頭への SIV スーパーチャレンジ実験で

誘導される SIV 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応を解析した。

## B. 研究方法

第 2 世代サル馴化型 HIV-1 (MN4-5S と MN5-10S) チャレンジを行ったカニクイサルのうち 4 頭に、チャレンジ後約 10 カ月の時点で、SIVmac239 をスーパーチャレンジした。スーパーチャレンジ後 2 週目と 5 週目の血漿中 SIV 量 (SIV RNA コピー数) を定量した。スーパーチャレンジ直前および 2 週間後の末梢血単核球 (PBMC) を分離し、SIV の Gag、Pol、Vif、Vpx・Vpr、Env、Tat・Rev、Nef 各々の抗原アミノ酸配列をカバーするオーバーラッピングペプチドを用いた抗原刺激特異的インターフェロン $\gamma$ 誘導を細胞内染色により測定することにより、SIV 抗原特異的 CTL 反応を解析した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、倫理面も含めて、東京大学医科学研究所および医薬基盤研究所の動物実験委員会の審査をうけ、その承認を得てから医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにて開始した。用いた組換え生物等については、第二種使用等拡散防止措置確認申請承認 (大臣確認) 済みである。

## C. 研究結果

第 2 世代サル馴化型 HIV-1 感染カニクイサル 4 頭 (C00-078、C05-097、C06-005、C06-030) について、SIV スーパーチャレンジ後 2 週目と 5 週目の血漿中 SIV 量を定量し、以前の実験で得られている結果 (ナイーブサルへの SIV チャレンジ後の血漿中 SIV 量と第 1 世代サル馴化型 HIV-1 感染サルへのスーパーチャレンジ後の血漿中 SIV 量) と比較した (図 1)。その結果、今回のスーパーチャレンジ実験では、サル馴化型 HIV-1 感染により SIV 感染に対して防御的な免疫反応が誘導されるかどうかについての結論を得ることができなかった。

これら第 2 世代サル馴化型 HIV-1 感染サル 4 頭のうち 3 頭では、SIV スーパーチャレンジ後に効率よい SIV 特異的 CTL 反応が認められた。特に 2 頭では、第 2 世代サル馴化型 HIV-1 と SIV が共有する SIV Vif 抗原特異的 CTL 反応が極めて高レベルに誘導されていた (図 2)。

## D. 考察

これまで、第 2 世代サル馴化型 HIV-1 感染により HIV-1 特異的 CTL 反応が誘導されることを確認してきたが、今回の SIV スーパーチャレンジ実験では、第 2 世代サル馴化型 HIV-1 と SIV が共有する SIV Vif 抗原特異的 CTL 反応が強く認められた。この系は、SIV Vif 特異的 CTL が SIV・HIV-1 増殖に対してもたらす影響の解明に有用であると考えられる。

## E. 結論

第 2 世代サル馴化型 HIV-1 感染サル 4 頭への SIV スーパーチャレンジでは、そのうち 2 頭で、第 2 世代サル馴化型 HIV-1 と SIV が共有する SIV Vif 抗原特異的 CTL 反応が強く認められた。このスーパーチャレンジ実験は、2 つのウイルスが共有する抗原が限定的であるため、その限定された抗原特異的 CTL 反応のウイルス複製抑制効果の解析に有用である可能性が考えられる。

## G. 研究発表

### 1 論文発表

- (1) Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, Matano T. Polyfunctional CD4<sup>+</sup> T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 83:5514-5524, 2009.
- (2) Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, Matano T. Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell help on control of a

simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. *J Virol* 83:9339-9346, 2009.

## 2 学会発表

- (1) Takahashi N, Tsukamoto T, Iwamoto N, Takahara Y, Naruse T, Kimura A, Matano T. Mapping of cytotoxic T lymphocyte epitopes in rhesus macaques showing vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/9/2009.
- (2) Matano T. Effect of vaccine-induced memory T cells on HIV/SIV replication after virus exposure. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji, Japan, 9/11/2009.
- (3) Tsukamoto T, Matano T. Impact of single epitope-specific CD8+ T cell memory induction by prophylactic vaccination on immunodeficiency virus control. AIDS Vaccine 2009, Paris, France, 10/20/2009.

(4) 岩本南、塚本徹雄、俣野哲朗. 広範な SIV 特異的細胞性免疫誘導機序の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京、10/26/2009.

(5) 齊藤暁、飯島沙幸、岩崎優紀、黒石歩、中山英美、塩田達雄、足立昭夫、野間口雅子、俣野哲朗、明里宏文. 第 2 世代サル指向性 HIV-1 クロームはカニクイザル個体において効率よく増殖する. 第 23 回日本エイズ学会学術集会、名古屋、11/28/2009.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

無し。

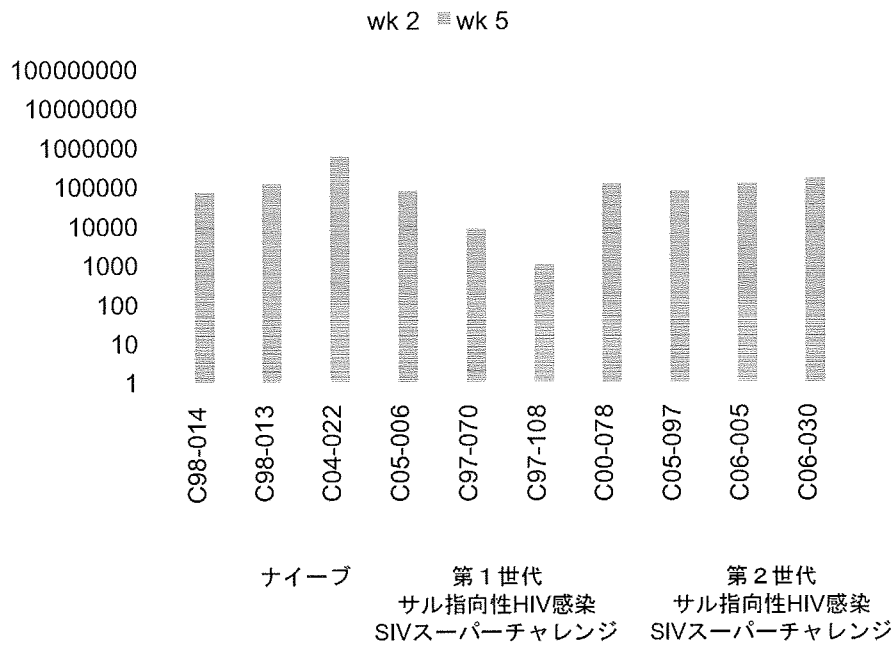


図1 SIVチャレンジ（スーパーチャレンジ）後の血漿中SIV量



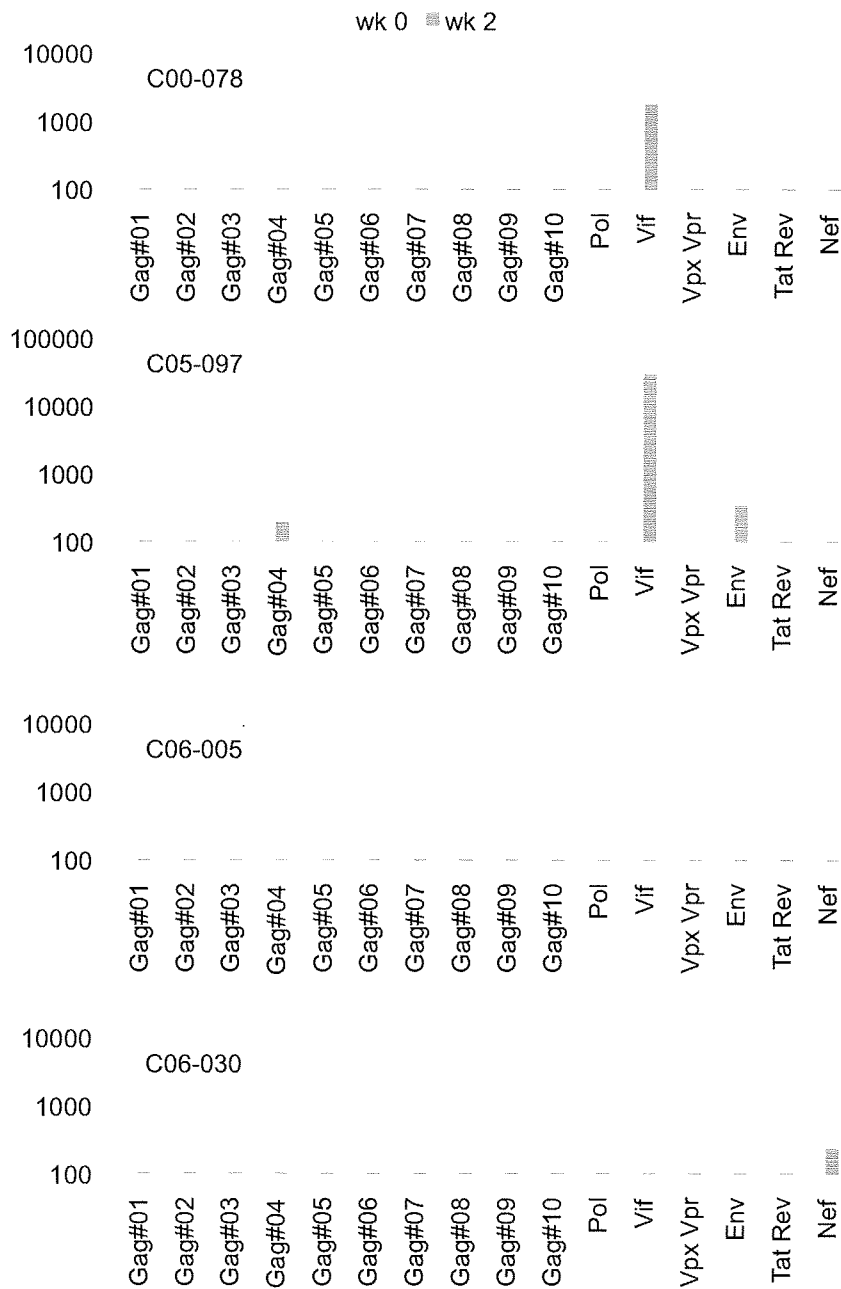


図2 サル指向性HIV感染後SIVスーパーチャレンジを行ったサルにおけるSIV各抗原特異的CTL反応  
 wk 0: スーパーチャレンジ直前、wk 2: スーパーチャレンジ後2週目

分担研究報告書

サル指向性 HIV-1 及びその馴化ウイルスの成熟粒子形成能に関する解析

研究分担者 櫻木淳一 大阪大学 微生物病研究所 ウイルス感染制御分野 助教

研究要旨 サル指向性 HIV-1 による in vivo 感染モデル系が実現しつつある現在、個体内ウイルス変異に伴うウイルスの性状の変化を多角的に解析するための実験系が必要となる。研究分担者は主としてウイルスゲノム RNA に関する解析を推進する目的で、動物レトロウイルスゲノム二量体化・ゲノム組換え・ゲノムパッケージング解析のための実験系の構築を試みた。その結果現在までに以下の成果を上げた。

1. レトロウイルスの粒子成熟過程とウイルス RNA 成熟ステップの相関について解析を行った。
2. レトロウイルスのゲノムパッケージングとゲノム翻訳との関係について RNase プロテクションアッセイ (RPA) を用いて解析した。

### A. 研究目的

サル指向性 HIV-1 による in vivo 感染モデル系の確立が視野に入りつつある。モデル個体内でのウイルス増殖が現実となった場合には、当然ながら個体内ウイルス変異に伴うウイルスの性状の変化を多角的に解析することが必要となる。ウイルス増殖の素過程の詳細は明らかでない部分も多い。研究分担者はこれまでにレトロウイルスのウイルスゲノム RNA に関する多くの独創的な研究を行い、報告している。研究分担者が蓄積してきたこうした知見を活用し、感染実験に備えて様々な実験系を構築し試行することは、モデル系の開発・改良に貢献しうる試みであると考えられた。研究分担者は主としてウイルスゲノム動態の解析を推進する目的で、動物レトロウイルスゲノム二量体化・ゲノムパッケージング解析を試みた。

### B. 研究方法

HIV-1 プロウイルス型プラスミド

pNL43 を母体としてすべての変異体を作成した。

ウイルスの粒子成熟過程を検証する変異体においては、5箇所の Gag 蛋白切断点各々にアミノ酸置換変異を導入し、切断が起こらないように改変した。さらにこの点変異を組み合わせて2重から5重変異体を作成した。Gag の切断についてはウェスタンブロットにて確認した。

293T 細胞にプラスミドをトランスフェクトし、48-72 時間後に上清を回収し超遠心にてウイルス粒子を精製した。精製粒子を用いて粒子内逆転写効率測定、ノザンブロット、電子顕微鏡による粒子形態解析を行った。透過電子顕微鏡によるウイルス粒子形態観察および計数は大阪医科大の微生物学研究教室との共同研究にて行われた。

様々なレトロウイルスの翻訳不能変異体を作成し、野生株とのコトランスフェクションにより産生するウイルス粒子中のゲノムの割合を算出した。

ネイティブノザンブロット・RNase

プロテクション・定量 PCR は定法に従って行った。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮を必要とする研究は行っていない。

### C. 研究結果

(1) 粒子成熟は HIV-1 Gag タンパク内の5つの切断点がウイルスプロテアーゼによってプロセシングされることによって起こるが、この5点の切断速度は順序があり、サイトによって切断速度に大きな差があることが生化学的解析によって明らかとなっている。つまり粒子の成熟過程は斉一なものではなく、いくつかの段階が存在していると考えられる。我々は各点に非切断変異を導入し、またこの変異を組み合わせることで粒子成熟過程が中断する一連の変異体を作成した。これらの変異体を用いて、粒子成熟過程におけるゲノム二量体化/粒子形態の変化についての観察を行った。

単変異体の観察から、ヌクレオカプシド(NC)末端の切断は N/C 末どちらも安定なゲノム二量体形成に影響を及ぼすことが明らかとなった。

粒子成熟過程では Gag の最初の切断点である p2-NC の切断によりゲノム二量体の安定化が一気に起き、引き続いて起こる他点の切断によって均一で安定した二量体が完成することが示唆された。

量論的解析からは、p2-NC の切断による二量体安定化には閾値が存在しない可能性が示された。

電子顕微鏡像による粒子形態観察の結果、ゲノム二量体化にはウイルスコアの形成は必要なく、粒子成熟に伴う形態変化とゲノム二量体化の間に必ずしも明確な同期は見られなかった。

ウイルス内逆転写能測定の結果、どの変異体粒子内にも十分な活性を持った逆転写酵素が存在するにもかかわらず、

p2-NC の切断があって初めてウイルスゲノムの逆転写が高いレベルで検出されることが明らかとなった。

(2) ウイルスのゲノムパッケージングとゲノム翻訳の関係性を探索する目的で、翻訳・非翻訳ゲノムを同時に細胞内で発現させ、産生ウイルス粒子あたりの両種のパッケージング効率を算出した。HIV-1 においては効率は翻訳の有無に影響されなかったが、HIV-2 においては非翻訳ゲノムの方がパッケージされにくい傾向があった(5割未満)。これは既報を裏付ける結果であったが、そのバイアスは文献で見られたものに比べやや低かった。これに対し SIVmac はその比率が7割に上昇しており、非翻訳 RNA を取込む能力には違いが見られた。

### D. 考察

正常なゲノム二量体化はウイルスが感染能を獲得するために必須の過程であると考えられる。今回の解析によりこの二つの多段階のステップは同期しつつ進行するものの、多くの転換点は互いに異なるという興味深い知見が得られた。

成熟過程のかなり早い段階でウイルス内でゲノムは逆転写の鋳型として機能することも示されたが、実際の粒子の細胞に対する感染能とは一致していない。このことは粒子成熟と脱殻や Trim などの宿主因子との関連を示唆するものとも考えられ、今後の検討課題になりうるものであった。特に SHIV においては種特異的宿主因子のバリアをどう越えるかが重要な点であり、今回の結果は効率良い増殖能を持つ SHIV 開発へ寄与する基礎的知見をもたらす可能性がある。

HIV/SIV のゲノムパッケージング能に関しては、HIV-2 と SIVmac のパッケージングスキームが異なる可能性があるという意外な結果が得られた。HIV-2 と SIVmac は遺伝子配列的には非常に近く、今回の機能的差異がどこに起因し

ているのかを追求することで宿主を変えた二つのウイルスの分岐点を明らかにできる可能性が考えられた。

#### E. 結論

HIV ゲノム二量体化とウイルス粒子産生時の粒子成熟との相関に関する解析を試み、ウイルス粒子がゲノム二量体化によって感染能を獲得するプロセスについての様々な新知見を得た。SIV のゲノムパッケージング機構について、HIV-2 とは異なっている可能性を指摘することができた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5alpha depends on combination of host and virus. H. Maegawa, T. Miyamoto, J.-i. Sakuragi, T. Shioda, and E. E. Nakayama. *Virology*, 399: 212-220, 2010.

##### 2. 学会発表

1) HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 櫻木淳一・大石真久・中野隆史・櫻木小百合・佐野浩一・塩田達雄 第57回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、東京。

2) HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 櫻木淳一・大石真久・中野隆史・櫻木小百合・佐野浩一・塩田達雄 第23回日本エイズ学会学術集会、一般口演、名古屋。

3) Relationship between virion maturation steps and genome dimerization of HIV-1 (Poster). M Ohishi and J-I Sakuragi. 7th International Retroviral Nucleocapsid Symposium, 2009 Sep, MN, USA.

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

なし。

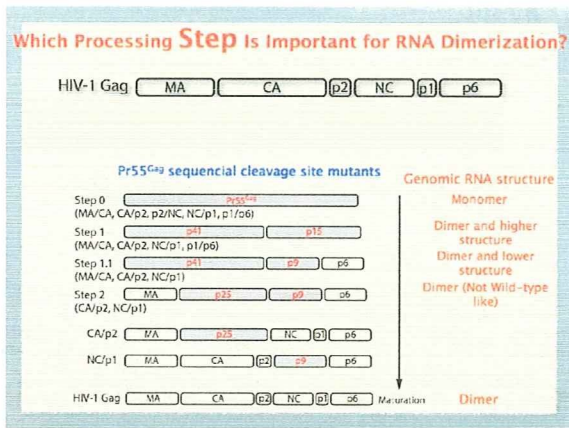


Fig.1 Gag の成熟段階を模倣した変異体の作成

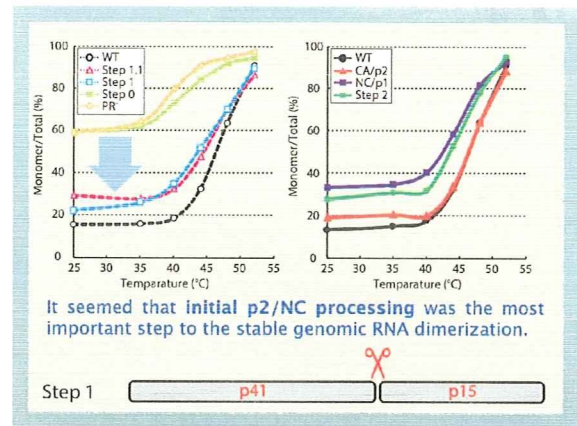


Fig.2 Gag の成熟段階とゲノム二量体化との相関

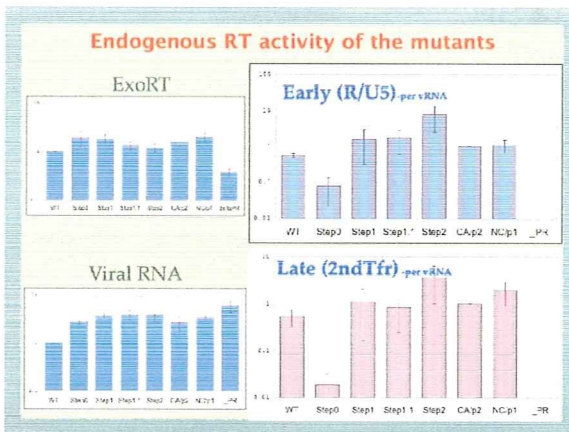


Fig.3 変異体のゲノムパッケージング、ウイルス内逆転写能の比較

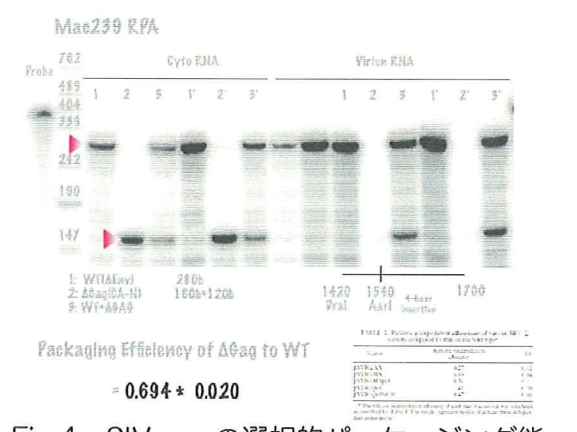


Fig.4 SIVmac の選択的パッケージング能

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hohjoh H, <u>Akari H</u> , Fujiwara Y, Hirai H, Wada K	Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene.	Gene	432	60-66	2009
Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, <u>Akari H</u> , Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T	Mdm2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif	Retrovirology	6	1	2009
Iwasaki Y, <u>Akari H</u> , Murakami T, Kumakura S, Dewan MZ, Yanaka M, Yamamoto N	Efficient inhibition of SDF-1 $\alpha$ -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists	Cancer Science	100	778-781	2009
Hassan R, Suzu S, Hiyoshi M, Takahashi-Makise N, Ueno T, Agatsuma T, <u>Akari H</u> , Komano J, Takebe Y, Motoyoshi K, Okada S	Dys-regulated activation of a Src tyrosine kinase Hck at the Golgi disturbs N-glycosylation of a cytokine receptor Fms.	Journal of Cellular Physiology	221	458-468	2009
<u>Akari H</u> , Iwasaki Y, Yoshida T, Iijima S	Non-human primate surrogate model of hepatitis C virus infection.	Microbiology and Immunology	53	53-57	2009
Nagao, T., Hatcho, K., Doi, N., Fujiwara, S., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Amino acid alterations in Gag that confer the ability to grow in simian cells on HIV-1 are located at a narrow CA region.	Journal of Medical Investigation	56	21-25	2009
Kamada, K., Yamashita, T., Hatcho, K., <u>Adachi, A.</u> , and Nomaguchi, M.	Evasion from CypA- and APOBEC-mediated restrictions is insufficient for HIV-1 to efficiently grow in simian cells.	Microbes Infection	11	164-171	2009
Kuroishi, A., Saito, A., Shingai, Y., Shioda, T., Nomaguchi, M., <u>Adachi, A.</u> , <u>Akari, H.</u> , and Nakayama, E.E.	Modification of a loop sequence between $\alpha$ -helices 6 and 7 of virus capsid (CA) protein in a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) derivative that has simian immunodeficiency virus (SIVmac239) vif and CA $\alpha$ -helices 4 and 5 loop improves replication in cynomolgus monkey cells.	Retrovirology	6	70	2009

Yamamoto T, Iwamoto N, Yamamoto H, Tsukamoto T, Kuwano T, Takeda A, Kawada M, Tsunetsugu-Yokota Y, <u>Matano T.</u>	Polyfunctional CD4+ T-cell induction in neutralizing antibody-triggered control of simian immunodeficiency virus infection	Journal of Virology	83	5514-5524	2009
Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, <u>Matano T.</u>	Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4+ T-cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques	Journal of Virology	83	9339-9346	2009
H. Maegawa, T. Miyamoto, <u>J.-i. Sakuragi</u> , T. Shioda, and E. E. Nakayama.	Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5alpha depends on combination of host and virus	Virology	399	212-220	2010
Jere, A., Fujita, M., Adachi, A., and Nomaguchi, M.	Role of HIV-1 Nef protein for virus replication in vitro.	Microbes Infection	12	65-70	2010
Yamashita, T., Nomaguchi, M., Miyake, A., Uchiyama, T., and Adachi, A.	Status of APOBEC3G/F in cells and progeny virions modulated by Vif determines HIV-1 infectivity.	Microbes Infection	12	166-171	2010
Fujita, M., Otsuka, M., Nomaguchi, M., and Adachi, A.	Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the current view of their virological functions.	Review in Medical Virology		in press	2010



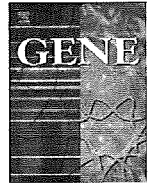
#### IV. 研究成果の刊行物・別刷



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/gene](http://www.elsevier.com/locate/gene)

## Molecular cloning and characterization of the common marmoset huntingtin gene

Hirohiko Hohjoh <sup>a,\*</sup>, Hirofumi Akari <sup>b</sup>, Yuko Fujiwara <sup>a,c</sup>, Yoshiko Tamura <sup>a</sup>, Hirohisa Hirai <sup>d</sup>, Keiji Wada <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Department of Molecular Genetics, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan

<sup>b</sup> Laboratory of Disease Control, Tsukuba Primate Research Center, National Institute of Biomedical Innovation, Tsukuba, Ibaraki, Japan

<sup>c</sup> Department of Degenerative Neurological Diseases, National Institute of Neuroscience, NCNP, Kodaira, Tokyo, Japan

<sup>d</sup> Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama, Aichi, Japan

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 July 2008

Received in revised form 4 November 2008

Accepted 5 November 2008

Available online 24 November 2008

Received by M. Di Giulio

#### Keywords:

Common marmoset

Huntingtin

Gene silencing

Immortalized cell line

### ABSTRACT

We report here for the first time the isolation and identification of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) huntingtin (*Htt*) gene, whose ortholog in humans is known to be related to Huntington's disease (HD). A 9396 nucleotide complementary DNA (cDNA) carrying the putative full-length open reading frame of the marmoset *Htt* gene was identified, and highly conserved nucleotide and amino acid sequences among primates were observed. Based on this data and using tools evaluated for the detection of the marmoset *Htt* gene, we have demonstrated gene silencing against the expression of endogenous *Htt* gene in immortalized common marmoset mononuclear cells by means of RNA interference (RNAi). Taken together, the data presented here may assist us in realizing a non-human primate HD model with the common marmoset.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Huntington's disease (HD) is an autosomal dominant neurodegenerative disease characterized by progressive and selective neural cell death associated with choreic movement and dementia (Walker, 2007). The responsible gene for HD, the huntingtin (*Htt*) gene, has been identified on chromosome 4q16.3 (Gusella et al., 1983; Gilliam et al., 1987), and an aberrant length of a CAG triplet repeat in exon 1, followed by expanded tracts of polyglutamine in the *Htt* polypeptide, is greatly involved in the onset of HD (Huntington's-Disease, 1993). Although the molecular mechanisms of either normal or aberrant *Htt* protein are still poorly understood, HD model animals (Mangiarini et al., 1996; Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000; von Horsten et al., 2003) and cells (Lunkes and Mandel, 1998) for understanding the pathogenesis of HD and developing therapies have been established by means of genetic engineering based on the genetic information of *Htt*. The use of an animal model that is closely related to humans may be particularly promising.

The common marmoset (*Callithrix jacchus*) is classified into the Callitrichidae family of Platyrrhini (New World monkeys) and has been

used as a non-human primate experimental animal in various research fields including gene therapy, autoimmune disease, organ transplantation, and pharmacology (Kendall et al., 1998; Doods et al., 2000; Deisboeck et al., 2003; t'Hart et al., 2003). Accordingly, it is worth promoting studies with the common marmoset aimed at overcoming neurodegenerative diseases such as HD, as the animal's close relationship to humans makes it well suited to this kind of study. Indeed, a recent study has generated a non-human primate HD model with the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) (Palfi et al., 2007; Yang et al., 2008).

In this report, we describe for the first time the isolation and characterization of a cDNA encoding the putative full-length open reading frame of the common marmoset *Htt* gene, and present experimental data based on the isolated cDNA. The data presented here may provide us with useful information for establishing non-human primate HD models with the common marmoset.

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Preparation of total RNA

Common marmoset total RNA was isolated from the brain tissue of a stillborn marmoset fetus and immortalized monocytes (described below) using Trizol (Invitrogen). The experiments with the common marmoset complied with protocols approved by the ethical committee for primate research of the National Center of Neurology and Psychiatry and adhered to the legal requirements of Japan.

**Abbreviations:** HD, Huntington's disease; *Htt*, huntingtin; RNAi, RNA interference; cDNA, complementary DNA; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; RT, reverse transcription; PCR, polymerase chain reaction; ORF, open reading frame; APP, amyloid precursor protein; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP, green fluorescence protein; CMV, Cytomegalovirus.

\* Corresponding author.

E-mail address: [hohjohh@ncnp.go.jp](mailto:hohjohh@ncnp.go.jp) (H. Hohjoh).

## 2.2. Established common marmoset cell lines

Adult common marmosets being reared at the Primate Research Institute of Kyoto University or Tsukuba Primate Research Center were anesthetized by ketamine, which was approved by the Animal Welfare and Animal Care Committees of both institutes, and peripheral blood was collected. From the collected blood samples, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified and immortalized by infection of a 488-77 strain of *Herpesvirus saimiri* (kindly provided by Dr. R. C. Desrosiers) as previously described (Akari et al., 1996). The established marmoset cell lines, designated HSCj-110, HSCj-009, and HSCj-002, were phenotypically activated CD3<sup>+</sup>T lymphocytic cells and grown in RPMI-1640 medium (Sigma) supplemented with 10% FCS, 50 mM 2-mercaptoethanol, and antibiotics.

## 2.3. Reverse transcription – (real time) polymerase chain reaction [RT-(real time) PCR]

The common marmoset total RNAs were subjected to complementary DNA (cDNA) synthesis using oligo(dT) primers and a Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, and polymerase chain reaction (PCR) using the cDNAs as templates was carried out by means of the ABI GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems). In the case of real time PCR, the cDNAs were examined by the AB 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) with a TaqMan Universal PCR Master Mix together with Assays-on-Demand Gene Expression products (Applied Biosystems) or a SYBR Green PCR Master Mix together with Perfect Real Time Primers (Takara Bio) or designed PCR primers, according to the manufacturers' instructions. Synthesized oligonucleotide primers and purchased primer and probe were as follows:

Synthesized oligonucleotide primers:

HD1-F: 5'-TATAGAATTCGGGAGACCCGCATGGCGAC-3'  
 HD1-ORF-R: 5'-TCAAGCGCCGCTCAGCAGGTGGTGACCTTG-3'  
 HD1-1900R2: 5'-TAAAGGATCCCCGTCTAACACAATTTTCAG-3'  
 cjHtt(1139)-F: 5'-TTATAGCTGGAGGCGGTTCC-3'  
 cjHtt(1254)-R: 5'-GACGTCGCACCTCGATTTCAG-3'

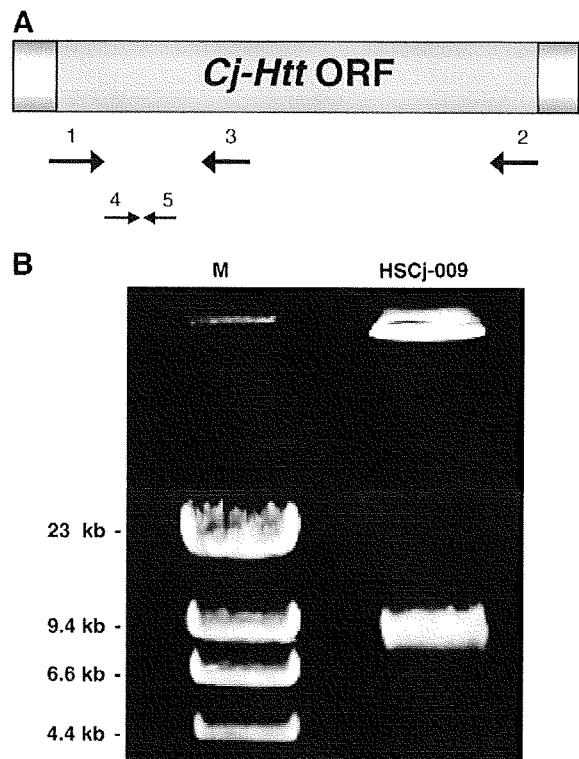
Purchased primer and probe:

Assays-on-Demand Gene Expression product for the human *Htt* gene (Assay ID: Hs00169273\_m1) (Applied Biosystems).

Perfect Real Time Primers for the human *GAPDH* gene (Primer-Set ID: HA067812) (Takara Bio).

## 2.4. Cloning and sequence analysis of the full-length ORF of the marmoset *Htt* gene

Complementary DNA derived from the common marmoset total RNA was subjected to PCR amplification using *TaKaRa LA Taq* polymerase (TAKARA BIO) with the HD1-F and HD1-ORF-R primers under the following thermal cycling conditions: heat denaturation at 94 °C for 1 min, 30 cycles of amplification including denaturation at 94 °C for 20 s and extension at 68 °C for 12 min, and a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR product was examined by agarose gel electrophoresis followed by ethidium bromide staining, and an approximately 9.4 kb PCR band (Fig. 1) was purified from the gels using a TOPO XL gel purification kit (Invitrogen). The resultant PCR product was inserted into the pCR-XL-TOPO plasmid with a TOPO XL PCR cloning kit (Invitrogen) and then sequence determination of the insert was carried out. To clarify uncertain nucleotide sequences, additional RT-PCR targeting of uncertain regions followed by sequence determination was performed and the precise nucleotide sequence was confirmed. The determined nucleotide sequence encoding a putative full-length ORF of the common marmoset *Htt* gene has been registered in the GenBank database: accession number, AB443866.



**Fig. 1.** RT-PCR amplification. (A) Schematic drawing of putative *Htt* cDNA. Open reading frame (ORF) is indicated by a yellow box. Arrows indicate synthesized PCR primers, which are designed in possibly conserved nucleotide sequences: 1, HD1-F; 2, HD1-ORF-R; 3, HD1-1900R2; 4, cjHtt(1139)-F; 5, cjHtt(1254)-R (detailed in Materials and methods). (B) RT-PCR. The first strand cDNA was synthesized by RT using RNA isolated from immortalized common marmoset mononuclear cells (HSCj-009) as a template and oligo(dT) as a primer. The following PCR was carried out using HD1-F and HD1-ORF-R primers. The resultant PCR products were analyzed by gel electrophoresis with 0.6 % agarose gel followed by ethidium bromide staining. Hind III-digested  $\lambda$ DNA was used as a DNA size marker (M).

## 2.5. Western blotting

Equal amounts (~35  $\mu$ g) of protein extracts from the common marmoset and mouse brain tissues and established PBMC lines (described above) were separated by SDS-PAGE with 5% polyacrylamide gels and electrophoretically blotted onto PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked for 1 h in blocking solution [5% non-fat milk in TBST buffer (25 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl and 0.1% Tween-20)] and incubated with 1/1000 dilution of mouse anti-huntingtin protein monoclonal antibodies [MAB2166 and MAB2170 (Chemicon); ab7666 (Abcam)] followed by washing in TBST buffer and further incubation with sheep anti-mouse Ig, HRP-linked whole Ab (GE Healthcare). Antigen-antibody complexes were visualized using ECL plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). After detection of signals, the membranes were subjected to antibody removal in Re-Blot Plus strong antibody stripping solution (Chemicon) followed by washing in TBST buffer, and then incubated with 1/1000 dilution of mouse anti-APP [MAB348 (Chemicon)] monoclonal antibody. Subsequent processes were the same as described above.

## 2.6. Gene silencing of marmoset *Htt* by RNA interference

To monitor gene silencing against the common marmoset *Htt* gene, we constructed a reporter plasmid carrying the 5'-terminal region of the marmoset *Htt* linked with the *GFP* reporter gene: the PCR product obtained from RT-PCR with the HD1-F and HD1-1900R2 primers was

**Table 1**  
Sequence homologies (%) among various species' *Htt* genes

<i>Homo sapiens</i>	<i>Callithrix jacchus</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
<i>Homo sapiens</i>	95.1 97.0	87.0 92.0	84.0 89.5	84.1 88.6	86.1 91.2	85.8 91.2
<i>Canis lupus familiaris</i>		86.6 91.4	84.0 88.4	83.9 87.9	85.6 90.8	85.1 90.9
<i>Callithrix jacchus</i>			84.5 89.4	84.4 89.7	84.0 89.2	83.8 89.3
<i>Bos taurus</i>				86.8 89.3	81.2 87.1	81.3 87.4
<i>Sus scrofa</i>					80.9 86.9	80.8 87.2
<i>Mus musculus</i>						95.9 97.6
<i>Rattus norvegicus</i>						

Figures in upper and lower stands represent nucleotide and amino acid sequence homologies, respectively, between two species.

trimmed with EcoRI and BamHI, and inserted into the pd2EGFP-N1 plasmid (Clontech) treated with the same restriction enzymes. The resultant reporter (5'*Cj-Htt-GFP*) plasmid and synthetic siRNA duplex targeting the marmoset *Htt* (*cjHtt-1* siRNA duplex) were cotransfected into mouse neuroblastoma Neuro2a cells by Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) as described previously (Sakai and Hohjoh, 2006). Two days after transfection, the cells were examined by a fluorescent microscope. When the endogenous marmoset *Htt* gene was inhibited by RNAi, the *cjHtt-1* siRNA duplex (0.4 nmol/transfection) was introduced into HSCj-009 cells ( $1 \times 10^6$  cells/transfection) by means of a Nucleofector system (Amaxa Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Two days after transfection, total RNA and cell lysate were prepared from the cells and examined by RT-real time PCR and Western blotting, respectively.

The nucleotide sequences of synthesized *cjHtt-1* siRNA were as follows:

Sense: 5'-GCCUUUGAGUCCUCAAGUUU-3'  
Antisense: 5'-ACUUGAGGGACUCAAGGCUU-3'

## 2.7. Sequence data and computational analyses

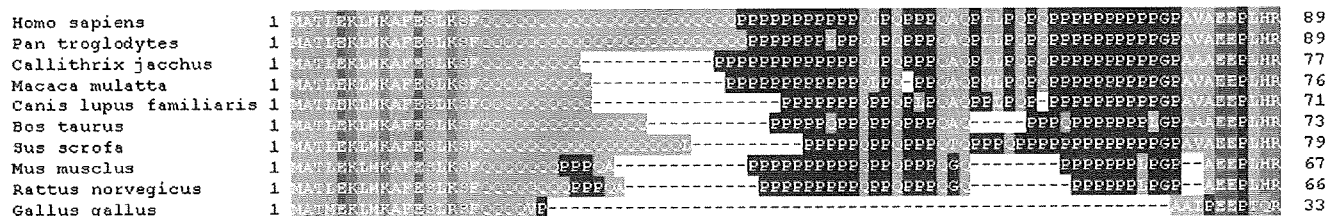
The *Htt* sequence data derived from various species were as follows [GenBank accession number]: human (*Homo sapiens*) [NM\_002111]; chimp (*Pan troglodytes*) [XM\_517080]; rhesus macaque (*Macaca mulatta*) [XM\_001086119]; canine (*Canis lupus familiaris*) [XM\_536221]; bovine (*Bos taurus*) [XM\_866758]; wild boar (*Sus scrofa*) [NM\_213964]; mouse (*Mus musculus*) [NM\_010414]; rat (*Rattus norvegicus*) [XM\_573634]; chicken (*Gallus gallus*) [XM\_420822]. Although the rhesus macaque *Htt* sequence [XM\_001086119] contains 20 undetermined nucleotides at positions 4932–4951 followed by 6 suspensive amino acid sequences, the sequence was used and examined together with the other sequences in this study.

Sequence homology analysis of either nucleotide or amino acid sequences was carried out by means of the GENETYX software (Software Development Co., Ltd., Tokyo, Japan), where all the parameters were set at default. For identification of the HEAT repeats in the *Cj-Htt* protein sequences, the REP program (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/papers/rep/search.html>) developed by Andrade et al. was used.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Isolation and characterization of the common marmoset *Htt* gene

To isolate and identify the common marmoset *Htt* (*Cj-Htt*) gene and/or gene products, we focused on conserved regions in the *Htt* gene and isolate cDNA clone of the *Cj-Htt* transcript. Highly homologous regions (sequences) between the human and mouse *Htt* genes, whose corresponding regions in the *Cj-Htt* gene were also expected to remain conserved, were selected, and PCR primers were designed for such regions. We add that such conserved regions are also detectable by BLAST search with the human *Htt* as a query on the Trace archive of the *Cj*-database in NCBI. RT-PCR with the designed primers and total RNA extracted from common marmoset brain tissue and established cell lines was carried out, and an approximately 9.4 kb long PCR product, which was expected to contain the full-length open reading frame (ORF) of *Cj-Htt*, was obtained (Fig. 1). The PCR product was subjected to sequence determination and then compared with various species' *Htt* genes. From the results, it was clear that the PCR product, which is 9396 nucleotides in length, was derived from the common marmoset *Htt* gene which encodes a predicted 3131 amino acid long *Cj-Htt* polypeptide (the sequence accession number in GenBank is AB443866). Sequence homologies in the *Htt* gene among various species are indicated in Table 1. From the data, it appears that both the nucleotide and predicted amino acid sequences of the *Cj-Htt*



**Fig. 2.** Alignment of amino acid sequences in the *Htt* exon 1 and its corresponding regions. Sequence data were aligned based on the human *Htt* exon 1 (top line). Amino acid residues are color-coded based on the biochemical properties of the residues: hydrophobic amino acids in orange, polar amino acids with uncharged R groups in green, acidic amino acids in pink, basic amino acids in light blue, and special amino acids in dark blue.