

2009J2025A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

HIV 感染病態に関わる宿主因子 および免疫応答の解明

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22年 3 月

研究代表者 横 田 恭 子
(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 感染病態に関わる宿主因子 および免疫応答の解明

平成21年度 総括・分担研究報告書

平成22年 3 月

研究代表者 横 田 恭 子
(国立感染症研究所)

平成21年度エイズ対策研究事業
「HIV感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明」班
班員名簿

横田 恭子	国立感染症研究所・免疫部	室長
徳永 研三	国立感染症研究所・感染病理部	主任研究官
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
塩田 達雄	大阪大学微生物病研究所	教授
梁 明秀	横浜市立大学医学部・微生物学	教授
小柳 義夫	京都大学ウイルス研究所	教授
宮澤 正顕	近畿大学医学部・免疫学教室	教授
田中 勇悦	琉球大学医学部・感染免疫学	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
立川 愛	東京大学医科学研究所・感染免疫学	助教
有吉 紅也	長崎大学熱帯医学研究所・臨床医学分野	教授
高橋 秀宗	国立感染症研究所・感染病理部	室長

目 次

I. 総括研究報告書

- HIV感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明 1
研究代表者： 横田 恭子

II. 分担研究報告書

1. 感染病態を制御する宿主抗ウイルス蛋白とそれを標的とする HIV-1蛋白の機能解析 11
研究分担者： 徳永 研三
2. マクロファージ感染に関与する宿主因子の同定 17
研究分担者： 石坂 幸人
3. HIV 感染阻害効果を示す宿主因子の構造機能相関 23
研究分担者： 塩田 達雄
4. HIV-1の粒子形成を司る宿主因子の同定とその分子機構の解析 27
研究分担者： 梁 明秀
5. 宿主因子によるHIV抑制法の開発研究 31
研究分担者： 小柳 義夫
6. HIV-1感染およびAIDS発症抵抗性遺伝子*Rac2*の発現調節と作用機序 37
研究分担者： 宮澤 正顕
7. ウイルスベクターワクチン抗原に対する免疫応答とHIV感染制御 41
研究分担者： 横田 恭子

8.	OX40L/OX40を介するHIV感染増殖抑制の研究 研究分担者：田中 勇悦	47
9.	HIV-1感染における調節性T細胞の意義 研究分担者：神奈木 真理	51
10.	HIV感染の病態進行に関わる免疫関連宿主因子の研究 研究分担者：立川 愛	55
11.	北タイHIV-1 CRF01_AE感染長期未発症者におけるCTL活性の 分子レベルの研究 研究分担者：有吉 紅也	59
12.	HIV-1の中和抗体誘導 研究分担者：高橋 秀宗	67
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	71

I . 総括研究報告書

HIV 感染病態に関わる宿主因子および免疫応答の解明

研究代表者 横田 恭子 国立感染症研究所免疫部 第一室長

研究要旨：HIV-1 と相互作用する宿主因子と多様な免疫応答の解析を行い、BST-2/Tetherin と Vpu、Vpr が関与する染色体への遺伝子挿入機構や自然免疫系シグナル、TRIM5 α の構造機能相関に関する新しい知見が得られた。更に、新規の宿主因子 TBK1 や CPSF6 が同定され、暴露非感染者の HIV 抵抗性にかかわる Rac2 イントロン 5 の遺伝子多型と CCR5/ β -ケモカインを介した感染抵抗性の機構が明らかになった。免疫応答に関しては *in vitro* での T 細胞活性化にかかわる分子として SLAM や OX40L のウイルス増殖への関与が示唆され、病態形成に重要と考えられる R5 型 HIV-1 選択的感染に関してもヒト化マウスモデルを用いた *in vivo* 解析系が確立された。更に、HIV 感染者における β -ケモカイン産生は病態形成に重要であることや調節性 T 細胞やサイトカインによる自然免疫系の発動、CTL の Gag 認識による細胞性免疫の有用性が示唆された。また、Gp41 の膜貫通領域近傍に対する中和抗体誘導可能な抗原も開発され、HIV に対する有効な免疫応答の解明に向けて前進した。

研究分担者

徳永研三（国立感染症研究所感染病理部・主任研究官）

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）

塩田達雄（大阪大学微生物病研究所・教授）

梁明秀（横浜市立大学医学部・教授）

小柳義夫（京都大学ウイルス研究所ウイルス病態研究領域・教授）

宮澤正顕（近畿大学医学部・教授）

田中勇悦（琉球大学医学部・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・免疫治療学分野・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感染症分野・助教）

有吉紅也（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

高橋秀宗（国立感染症研究所感染病理部・室長）

A. 研究目的

制御不能な HIV 増殖と潜伏感染リザーバーの存在はエイズ病態形成の主たる要因である。本

研究班では、ウイルス制御に関わる宿主因子の同定とその作用機構の解明、HIV 感染後の病態形成に重要な役割を果たす多様な抗 HIV 免疫応答の解析を 2 本の柱とし、宿主因子を利用したウイルス増殖制御と有効な抗 HIV 免疫応答誘導による感染拡大・潜伏化の阻止をめざす。

B. 研究方法

宿主因子によるウイルス制御

1) BST-2/Tetherin, Vpr-RRE, Rev, EGFP 発現ベクターを細胞にトランスフェクトし、Vpu と BST-2 との相互作用、細胞内局在や細胞内分解経路をフローサイトメトリーや蛍光顕微鏡を用いて解析した（徳永）。2) HIV-1 感染マクロファージに X 線を照射して DSB(DNA double strand breaks)を導入し、ATM の阻害剤による挿入効率の変化を比較した。制限酵素 SceI を利用した人工的 DSB 誘導 THP-1 細胞で組込部位のウイルス DNA コピー数、近傍遺伝子配列を解析した。また、精製 Vpr をマクロファージに加え、酸化型フォスファチジルコリン(OxPC)に対する抗体(DLH3)を用いて

IL-6 産生誘導における OxPC の関与を調べた(石坂)。3)異なるサル種 TRIM5 α 間のキメラをヒト細胞に導入し、これらの抗 HIV-2 作用を解析した(塩田)。4)コムギ無細胞タンパク質合成系を用いてビオチン標識プロテインキナーゼ蛋白ライブラリーを作製し、HIV-1 protease により切断される蛋白をホモジニアスプロキシミティアッセイ・アルファスクリーンで解析した(梁)。5)cDNA ライブラリー発現レンチウイルスベクター導入 MT-4 細胞から新規 HIV 抑制宿主分子の単離同定を行い、その HIV-1 感染抑制効果を確認した(小柳)。6)イタリアとタイ・ランパンコホートの暴露非感染者と感染者において *Rac2* 遺伝子の機能的イントロン多型を同定し、発現調節領域のコア配列部分断片の変異導入や siRNA による *Rac2* 発現抑制効果を解析した(宮澤)。

抗 HIV 免疫応答の解析

7)異なる蛍光を発する HIV-1 や野生型麻疹ウイルスを用い、感染時のウイルスと細胞の相互作用について in vitro で解析した。また、in vivo 解析のため、ヒト臍帯血幹細胞移入免疫不全マウス(ヒト化マウス)の HIV-1 感染モデルを確立し、R5 と X4 型 HIV-1 の感染様式の違いを解析した。更に、CCR5 を発現する細胞への entry (Vpr-BlaM 含有ウイルスとの融合)および qPCR による逆転写の効率を測定した(横田)。8)PBMC を固相化抗 CD3 抗体で活性化し、R5 型 JR-FL を感染させて、OX40L 発現細胞や組換え OX40L (R&D 製)を添加した培養上清中のサイトカイン量と HIV-1 増殖を測定した(田中)。9)ラット T 細胞株 G14 をラットに3回皮下に免疫し、脾臓 T 細胞を分離した。抗原刺激に対する T 細胞応答として、サイトカイン産生量を ELISA で、細胞増殖を ³H-thymidine uptake で測定した(神奈木)。10)血中 HIV 量の異なる未治療と治療中 HIV 感染者の PBMC を PHA で刺激し、培養後の上清中のサイトカイン(25種類)を測定した。また、これら感染者 T 細胞において分化段階を表す表面抗原 (CD45RA, CCR7) と活性化や疲弊状態を表す抗原 (CD38, Ki67, PD-1, CTLA-4) の発現をフローサイトメ

ーターで解析した(立川)。11) CRF01_AE Gag のオーバーラッピングペプチドを抗原とする ELISpot アッセイを実施し、HLA 型とエピトープの相関、臨床経過等を統計解析した(有吉)。12) broad spectrum を持つ中和抗体の作製を目的として、精製 HIV-1 様粒子からディタージェントにより脂質二重膜を取り除いた Core-Env 抗原を調整し、マウスに免疫した。得られた抗血清やモノクローナル抗体の HIV-1 中和能および env 蛋白への結合性を計測した(高橋)。

(倫理面への配慮)

該当する実験は各施設の医学研究倫理委員会による倫理審査を受けて承認を得、個人情報保護法に基づいて患者情報の徹底管理下を実施される。動物実験は各施設の実験動物委員会の承認を得、動物愛護の精神に則り、動物に与える苦痛の軽減と排除に努める。

C. 研究結果

宿主因子によるウイルス制御

1)Vpu は BST-2 と膜貫通領域で相互作用すること、また、部分的に宿主因子 β TrCP(ユビキチンライゲース複合体サブユニット)に依存して細胞表面上の BST-2 を細胞内に internalize し、ライソゾーム分解へと導くことを明らかにした(徳永)。2) X 線照射によりマクロファージのプロウイルス DNA ゲノム挿入頻度が増加し、ATM 阻害剤はこれを抑制した。DSB 部位へのプロウイルス挿入はインテグラーゼの catalytic activity 非依存的であった。また、Vpr による IL-6 産生誘導には OxPC の生成を介した TLR4/MyD88-MAP 依存的な細胞内シグナルが関与していた(石坂)。3)アカゲザル TRIM5 α の広範な HIV-2 感染阻害効果は、多型の認められる variable region 1 (V1)領域の 339 から 341 番目までの3つのアミノ酸 TFP によって決定されていた。また、ヒヒ TRIM5 α の V2 領域の 385 番目のアミノ酸置換(プロリンからセリン)はヒヒ TRIM5 α の抗 HIV-2 活性を減弱させることが明らかとなった(塩田)。4)HIV-1 プロテアーゼにより特異的に切断されるプロテインキナーゼとして TBK1 を同定

し、切断部位は 1683/V684 であることを明らかにした。更に、TBK1 と HIV-1 プロテアーゼの結合は TBK1 を活性化し、IRF3 のリン酸化と IFN β 産生を促進することが示唆された(梁)。5) HIV-1 感染抵抗性を示す細胞に組み込まれたレンチウイルスがコードする cDNA を解析し、Cleavage and polyadenylation specific factor 6 (CPSF6) の 170~360 アミノ酸からなる欠損変異体を同定した。CPSF6 欠損変異体は HIV-1 の感染・複製を強く抑制した(小柳)。6) 曝露非感染者ゲノムに特徴的な *Rac2* の第 5 インترون遺伝子領域の多型がエンハンサー機能を左右することを明らかにした。*Rac2* の高発現を抑制すると CCR5 の発現が増加し、 β ケモカインの発現が低下し、CCR5 指向性 HIV-1 に対する複製抑制効果が失われた。従って、*Rac2* の高発現は CCR5 の低発現と β ケモカインの高発現を誘導し、その結果 R5 型 HIV-1 に対する感染抵抗性が賦与されると考えられる(宮澤)。

抗 HIV 免疫応答の解析

7) 活性化 T 細胞では HIV-1 感染により野生型麻疹ウイルス受容体 SLAM の発現が増大し、env 以外の HIV-1 蛋白の関与が示唆された。ヒト化マウスの系においては高度に活性化された CCR5 陽性 CD4⁺T の頻度が高く、R5/X4 型混合感染時の R5 感染頻度は X4 よりも高いが、これら R5 感染細胞の CXCR4 の発現は X4 感染 CCR5 陰性細胞と同程度であった。また、ヒト PBMC より分画した CCR5 陽性細胞は CXCR4 も発現しており、X4 と R5 で細胞侵入・逆転写の過程に差はなかった(横田)。8) OX40Ligand による OX40 刺激は活性化した PBMC に β ケモカイン産生を誘導し、R5 型 HIV-1 の感染増殖を抑制した。また R5 型 HIV-1 による PBMC での合法体形成も完全に抑制した(田中)。9) ラット G-14 は IL-2 依存性の CD4⁺CD8⁺CD25⁺T 細胞で、恒常的に IFN- γ を産生しており、MHC class II 分子上の自己抗原を認識すること、この細胞をラットに免疫して得られた IL-2 と抗原依存的に増殖する 8L は CD4⁺CD25⁺ CTLA4⁺T 細胞株で、

IL-10 を産生する誘導型の調節性 T 細胞であることが示唆された。(神奈木) 10) 血中ウイルス量の異なる HIV 感染者間の免疫学的特性を比較した結果、非特異的に刺激した血中ウイルス量が高い感染者(HVL)の PBMC においては β ケモカイン(MIP-1 α /1 β / RANTES)、IL-2R、IL17 および IL-7 の産生低下が見られ、VL と逆相関していた。これら HVL の T 細胞は高度に活性化 (CD38⁺/Ki67⁺) され、疲弊状態 (PD-1⁺/CTLA-4⁺) にあった。また、記憶 T 細胞 (CM/EM) のこれらサイトカイン産生能と PD-1/CTLA-4 陽性細胞頻度は逆相関していた(立川)。11) 北タイ長期未発症者コホートを拡充させた。未治療 HIV 感染者コホート 139 名の CRF01_AE Gag オーバーラッピングペプチドに対する反応において、CTL 認識の広さ (Breadth) と強さ (Magnitude) は CD4 値とは正、ウイルス量とは負の相関があった。Gag のうちでも p24 コア領域の認識がウイルス量の低さに関与し、この部位の変異は CD4 値とは負、ウイルス量とは正の相関があった。また、新しく 41 通りのペプチド認識と HLA アリルとの相関が明らかとなった(有吉)。12) 免疫抗血清は 100 倍以上の希釈で中和可能であった。得られたモノクローナル抗体の中には、レセプター発現が低い標的細胞では 0.2 μ g/ml 以下で X4 と R5 両方の感染を中和するものも存在したが、レセプター発現が高い標的細胞では中和活性を失った。X4(NL43) env の 15 アミノ酸ペプチドライブラリーに対する反応性を解析した結果、中和抗体は gp41 の membrane proximal external region (MPER) を認識することが明らかとなった(高橋)。

D. 考察

Vpu と宿主因子に関して詳細な解析がなされ、Vpu が BST-2 をライゾームで分解する新たな経路や Vpu と BST-2 の TM-TM 間相互作用という新しい知見が得られた。また、X 線照射による DSB はマクロファージの様な静止期細胞への感染でのみ認められる現象であること、DSB では integrase に依存しない組込みがお

このことから、Vpr による DSB はマクロファージへの HIV 感染時における proviral DNA の integration に (頻度は少ないながらも) 貢献する可能性が示唆された。また、Vpr の多様な機能の一つとして、oxidative stress を誘導して自然免疫系を活性化する新たな経路も明らかにされた。HIV 感染者でこの機構が免疫病態の形成に関与しているかどうかは今後検証していく必要がある。宿主の自然抵抗性因子として知られ、サル間でも種特異性を担う TRIM5 α の遺伝子情報をもとに蛋白構造学的な解析がなされた結果、C 末側 SPRY 領域内で遺伝子多型が認められる V1 と V2 領域が形成する立体構造がウイルスカプシドの認識と HIV-2 感染阻害に重要であることが示唆され、構造と機能の相関が明確になった。また、新たな網羅的アプローチにより同定された宿主因子としては、TBK1 が HIV-1 プロテアーゼの基質にもなることが明らかになり、自然免疫シグナルと HIV 感染との関係が示唆された点は興味深い。一方、HIV-1 感染抵抗性を示す細胞株から同定された CPSF 欠損変異は自然にも存在するかどうかは今後検討していく必要があるが、その高い HIV-1 増殖抑制活性を利用して新たな治療法開発への可能性が期待される。更に、曝露非感染者の感染抵抗性を賦与すると考えられる遺伝子領域から民族の違いを超えて Rac2 インترون 5 の遺伝子多型が同定された。その機構として、Rac2 インترونがエンハンサー機能を有しており、Rac2 を高発現させる結果、CCR5 や β -chemokine が発現調節され、CCR5 指向性 HIV-1 感染を阻害することが示唆された。これは結果として CCR5 欠損の遺伝子型と類似しているが、Rac2 高発現はこれ以外にも感染細胞内でウイルスに対抗する別の機構を誘導する可能性も考えられる。

免疫応答の解析には適切なモデル系の確立が必要となる。Gag 発現麻疹ウイルスや麻疹外皮被覆レンチウイルスベクター等をワクチン候補として応用するためには、両ウイルス存在下での細胞間相互作用を *in vitro* で解析することが基礎的段階として重要である。更に、

in vivo でのウイルスと細胞の相互作用を模倣した系としてヒト化マウスのような小動物モデルの利用は今後とも有用である。また、抗原提示細胞と T 細胞の免疫シナプスを介する刺激の一つ OX40/OX40L シグナルが β ケモカインの産生を促進して R5 HIV-1 感染拡大を抑制するという知見は新しい OX40L の免疫機能であり、この意義に関しても小動物モデルでの検証が期待される。調節性 T 細胞と思われる細胞株の樹立は、今後 HIV-1 潜在感染に関する研究に有用なツールとなる可能性がある。臨床的には、血中に大量にウイルス抗原が存在する感染者の病態は β ケモカインの産生低下、慢性的活性化と疲弊に伴う T 細胞機能低下に関係し、これらの細胞免疫マーカーの変化はウイルス量と関連していることが示された。この現象が結果か原因かという議論はあるにしても、この班研究で共通して β ケモカインの病態形成における役割、R5 型 HIV-1 の選択的感染を制御することの重要性が浮き彫りになってきた。また、アジア特有の CRF01_AE 株感染で Gag 領域に対する CTL 認識の幅と強度が臨床経過と相関するという結果は、B 株と同様 CTL による Gag 認識の重要性を示唆している。このような細胞性抗 HIV 免疫が一部の感染者では明らかに有効に機能していること、幅広く中和活性のある特異的抗体誘導をめざしたワクチン開発も不可能ではないという結果を踏まえ、今後とも目標達成に向けて各研究者の一層の努力と共同研究の強化が望まれる。

E. 結論

宿主因子によるウイルス制御

1) Vpu は細胞表面 BST-2 を標的として細胞内に internalize し、一部 β TrCP-1 及び-2 依存性にライソゾーム分解経路に導く。また、BST-2 は N 末と C 末の両方で細胞膜にアンカリングすることにより Vpu と TM-TM 間で相互作用する。2) 静止マクロファージではウイルス DNA の染色体への挿入の過程に DSB シグナルが「正」の因子として作用しており、DSB サイトへのウイルス DNA の挿入の際には IN 活性を必要としない可能性が示唆された。また、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 OxPC の生成を介した自然免疫シグナルに関係し、Vpr の新たな機能として考えられた。

3) 旧世界ザルのアカゲザル、カニクイザル、ヒヒの TRIM5 α の HIV-2 感染阻害作用が大きく異なり、SPRY 領域の種間で長さや配列に多型が認められる V1 領域と V2 領域のアミノ酸配列がその HIV-2 感染阻害作用を決定していることが明らかになった。旧世界サルを利用したサル感染モデルを構築する上では TRIM5 α のこれらの領域にある種内の多型も考慮する必要がある。

4) HIV タンパク質と宿主因子の機能的相互作用について、コムギ無細胞タンパク質合成系とアルファスクリーンを用いて、HIV プロテアーゼにより切断を受ける宿主プロテインキナーゼ TBK1 を同定した。自然免疫系シグナルにおける HIV の関与が示唆された。

5) レンチウイルスベクターを用いたスクリーニングにより、HIV 抑制因子として CPSF6 欠損変異体が単離された。この欠損変異体遺伝子の導入により、レンチウイルスベクターおよび野生型 HIV-1 の感染は抑制された。

6) イタリアコホートとタイ・ランパンコホートの両方で、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 第 5 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。遺伝子発現調節機能に特に重要なのは、曝露非感染者群と HIV-1 感染者群で塩基置換のある rs2284037 と rs4140870 を含む約 800 bp の範囲である。siRNA を用いた Rac2 発現抑制実験の結果、Rac2 高発現は CCR5 発現抑制と CCL5 発現増強を介して機能的に CCR5 指向性 HIV-1 の吸着侵入過程を阻害している可能性が示された。

抗 HIV 免疫応答の解析

7) HIV-1 感染により活性化 T 細胞の SLAM 発現が増強され、HIV-1 がコードする envelope 以外の蛋白の関与が示唆された。免疫応答における SLAM の発現調節については不明な点が多く、今後その機構の解明が必要である。また、ヒト化マウスを用いた *in vivo* 解析とヒト末梢血 CD4⁺T 細胞での *in vitro* 解析において、R5 型の選択的な増殖にはケモカインレセプター発現以外の何らかの機構が関与していると考

えられた。ヒト化マウスの感染モデルは治療やワクチン効果の評価のための有望なモデルである可能性が示された。

8) OX40L による OX40 の副刺激は、活性化 PBMC に R5 HIV-1 の感染抑制性 β ケモカインの産生を促し、R5 HIV-1 感染初期の増殖を優位に抑制することから、この分子の HIV-1 感染阻止およびエイズ阻止への応用が期待される。

9) 自己反応性 T 細胞株を免疫したラットから反応性の T 細胞を誘導し、HIV-1 潜在感染実験系を作成するために必要となる調節性 T 細胞株を樹立した。

10) 病態進行の早い (AIDS 発症までの期間が短い) VL の高い感染者では、慢性的な活性化や疲弊によると考えられる型特異的なメモリー T 細胞の機能不全が顕著であった。今後は Th1、Th17 型メモリー T 細胞特異的な機能低下の分子メカニズムを明らかにする。

11) 北タイの CRF01_AE 感染者コホート患者においても Gag に対する CTL のより広い認識 (Breadth) とより強い認識 (Magnitude)、p24 コア抗原領域に対する CTL 免疫圧がより良い臨床経過と相関した。エピトープの大部分は過去に他のサブタイプで報告されてない新しいものであり、CTL エピトープの大部分はサブタイプ特異的であることが明らかとなった。

12) HIV-1 様粒子からディタージェントにより宿主膜蛋白、膜脂質を除いて作製した Core-Env 抗原は、MPER を認識する広域中和抗体の誘導抗原として有効な可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamamoto, T., Samri, A., Mitsuki, Y.-Y., Mizukoshi, F., Kobayashi, K., Inoue, J.-I., Autran, B. and Tsunetsugu-Yokota, Y.: siRNA inhibiting HIV-1 reactivation restores function of HIV-specific CD4⁺ T cells in chronically HIV-infected individuals. *AIDS*, 23:2265-2275, 2009.
- 2) Yamamoto, T., Tsunetsugu-Yokota, Y.,

- Mitsuki, Y-Y, Mizukoshi, F., Terahara, K., Inagaki, Y., Yamamoto, N., Kobayashi, K. and Inoue, J-I.: Selective transmission of R5 HIV-1 over X4 HIV-1 at the dendritic cell-T cell infectious synapse is determined by the T cell activation state. *PLoS Pathogen*, 5:e1000279, 2009.
- 3) Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K.: HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *J. Biol. Chem.* 284: 35060-72. 2009.
 - 4) Hoshino, S., Konishi, M., Mori, M., Shimura, M., Nishitani, C., Kuroki, Y., Koyanagi, Y., Kano, S., Itabe, H. and Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J. Leukocyte Biol.* 87: (doi:10.1189/jlb.0809547) 2010.
 - 5) Shinoda Y, Hieda K, Koyanagi Y, Suzuki Y.: Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector. *Virus Genes.* 25: 165-175, 2009.
 - 6) Yoshida T, Ebina H, Koyanagi Y :N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol. Immunol.* 53:629-635, 2009.
 - 7) Miyakawa K, Ryo A, Murakami T, Ohba K, Yamaoka S, Fukuda M, Guatelli J, Yamamoto N: BCA2/Rabring7 promotes tetherin-dependent HIV-1 restriction. *PLoS Pathog.* 5(12):e1000700, 2009.
 - 8) Ohba K, Ryo A, Dewan MZ, Nishi M, Naito T, Qi X, Inagaki Y, Nagashima Y, Tanaka Y, Okamoto T, Terashima K, Yamamoto N: Follicular dendritic cells activate HIV-1 replication in monocytes/macrophages through a juxtacrine mechanism mediated by P-selectin glycoprotein ligand 1. *J Immunol.* 183(1):524-32, 2009.
 - 9) Miyazawa M., L. Lopalco, F. Mazzotta, S. Lo Caputo, F. Veas, and M. Clerici. The "immunologic advantage" of HIV-exposed seronegative individuals. *AIDS* 23:161-175, 2009.
 - 10) Miyazawa, M. and M. Clerici. The 'immunologic advantages' of HIV-exposed seronegative individuals: authors' reply. *AIDS* 23:1612, 2009.
 - 11) Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, Tanaka R, Hamatake M, Okuma K, Huang W, Toma J, Komano J, Yanaka M, Tanaka Y, Yamamoto N. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob Agents Chemother.* 53:2940-48, 2009.
 - 12) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Selective infection of CD4+ effector memory T lymphocytes leads to preferential depletion of memory T lymphocytes in R5 HIV-1-infected humanized NOD/SCID/IL-2R γ manull mice. *Virology.* 394(1):64-72. 2009
 - 13) Nishitsuji, H., Hayashi, T., Takahashi, T., Miyano, M., Kannagi, M., and Masuda, T. Augmentation of reverse transcription by integrase through an interaction with host factor, SIP1/Gemin2 Is critical for HIV-1 infection. *PLoS One* 4:e7825, 2009.
 - 14) Nunoya J, Nakashima T, Kawana-Tachikawa A, Kiyotani K, Ito Y, Sugimura K, Iwamoto A. Short communication: generation of recombinant monoclonal antibodies against an immunodominant HLA-A*2402-restricted HIV type 1 CTL epitope. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 25:897-904, 2009
 - 15) Mizutani T, Ishizaka A, Tomizawa M, Okazaki T, Yamamichi N, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Iba H. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin

- remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of HIV-1 transcripts. *J Virol.* 83:11569-80, 2009.
- 16) Kono K, Bozek K, Domingues FS, Shioda T, Nakayama EE. Impact of a single amino acid in the variable region 2 of the old world monkey TRIM5a SPRY (B30.2) domain on anti-human immunodeficiency virus type 2 activity. *Virology* 388(1):160-8, 2009.
- 17) Kuroishi A, Saito A, Shingai Y, Shioda T, Nomaguchi M, Adachi A, Akari H, Nakayama EE. 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.
- 18) Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya JI, Ohtani H, Mehra N, Shioda T, Kimura A. Impact of novel TRIM5alpha variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS.* 23(16):2091-100, 2009.
- 19) Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha). *Reviews in Medical Virology* 20:77-92, 2010.
- 20) Maegawa H, Miyamoto T, Sakuragi J, Shioda T, Nakayama EE. Contribution of RING domain to retrovirus restriction by TRIM5 α depends on combination of host and Virus. *Virology* 399:212-220, 2010.
- 21) Takahashi, H. Kitagawa, Y. Maeda-Satoh, M. Hasegawa, H. Sawa, H. Sata, T. Monoclonal antibody and siRNAs for topoisomerase I suppresses telomerase activity. *Hybridoma* 28(1): 63-65. 2009
- 22) Kitagawa, Y. Maeda-Sato, M. Tanaka, K. Tobiume, M. Sawa, H. Hasegawa, H. Kojima, A. Hall, WW. Kurata, T. Sata, T. Takahashi, H. Covalent bonded Gag multimers in human immunodeficiency virus type-1 particles. *Microbiol Immunol.* 53(11):609-620. 2009
- 23) G Gesprasert, N Wichukchinda, M Mori, T Shino, W Auwanit, B Sriwanthana, P Pathipvanich, P Sawanpanyalert, T Miura, P Auewarakul, A Thitithanyanont, K Ariyoshi. HLA-associated immune pressure on Gag protein in CRF01_AE infected individuals and its association with plasma viral load. *PLos One* 2010 (in press)

2. 学会発表

[国際学会]

1) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Characterization of HIV-1 pathogenesis and the infected cells in humanized mice. 16th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Montreal, Feb. 2009.

2) Kawana-Tachikawa A, Nakayama K, Odawara T, Fujii T, Iwamoto A. Importance of Gag-specific cellular immunity to control HIV in Japanese population. 5th IAS Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention. Capetown, South-Africa, July 2009.

3) Takahama S, Sawasaki T, Okayama A, Akagi T, Endo Y, Yamamoto N, Ryo A. Atypical protein kinase C positively regulates the Vpr incorporation into HIV-1 particles by phosphorylating Gag p6. The 10th Kumamoto AIDS Seminar, Sep. Kumamoto, 2009.

4) Miyazawa, M., Kanari, Y., Clerici, M., Wichukchinda, N., and Auwanit, W. Genetic factors that confer resistance to HIV-1 acquisition in HIV-1-exposed but seronegative individuals in Italy and Thailand. 4th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases. Nagasaki. Nov. 2009.

5) Tatsuo Shioda. A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of TRIM5 α . The 21st Retroviral Pathogenesis Workshop, Il Ciocco, Italy, Sep. 2009.

6) Takahashi, H. Immunogen utilizing the stable

interaction of cytoplasmic tails of HIV-1 envelope and cores. AIDS vaccine 2009 conference. Paris, France, October, 2009

7) A Rojanawiwat, N Tsuchiya, P Pathipvanich, W Auwanit, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi: Opportunistic infections before and after the national antiretroviral program in Thailand. The 9th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Bali, Indonesia. August, 2009

8) P Pathipvanich, N Tsuchiya, A Rojanawiwat, W Auwanit, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi: Over 10 years of experience of treating HIV/AIDS patients at a government hospital in Thailand. The 9th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific. Bali, Indonesia. August, 2009

9) Yukihiro Ishizaka. Detection of Vpr in plasma of HIV-1-positive patients and Vpr-induced genomic instability: implication for HIV-1-associated malignancies. The 4th German-Japanese HIV-Symposium. Bochum, Germany, March, 2009.

[国内学会]

1)光木裕也、水越文徳、渋沢謙太郎、寺原和孝、竹田誠、柳雄介、森川裕子、山岡昇司、横田(恒次)恭子: HIV-1感染と麻疹ウイルス感染が相互の及ぼす影響およびその機構の解析、第57回ウイルス学会、東京、平成21年11月。

2)渋沢謙太郎、光木裕也、寺原和孝、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子: 樹状細胞を標的としたHIV-1増殖抑制shRNA発現レンチウイルスの開発、第39回日本免疫学会、大阪、平成21年12月。

3)土屋貴嗣、光木裕也、寺原和孝、渋沢謙太郎、小林和夫、渡邊俊樹、横田(恒次)恭子: CD4標的レンチウイルスベクターの開発、第32回日本分子生物学会、横浜、平成21年12月。

4)徳永研三: HIV-1の遺伝的多様性: その薬剤耐性とウイルス複製機序への影響。第19回感染研シンポジウム「感染症コントロールにおける国際協力: 感染研とパスツール研の協力」2009. 6.

5)岩部幸枝、藤田英明、石坂幸人、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三: HIV-1 Vpuによるウイルス放出抑制因子 BST-2/Tetherin の細胞内分解

経路の解明。第57回日本ウイルス学会総会(東京)2009. 10.

6)岩部幸枝、藤田英明、石坂幸人、田中嘉孝、佐多徹太郎、徳永研三: HIV-1 Vpu と BST-2/Tetherin の Transmembrane 領域間における相互作用。第57回日本ウイルス学会総会(東京)2009. 10.

7)岩部幸枝、巽正志、佐多徹太郎、徳永研三: HIV-1 サブタイプC由来 Vif 蛋白の機能解析。第57回日本ウイルス学会総会(東京)2009. 10.

8)小林朋子、芳田剛、佐藤佳、Peter Gee、蝦名博貴、小柳義夫: Bst-2 と HIV-1 Vpu の相互作用メカニズムの解析。第57回日本ウイルス学会学術集会、2C03、東京、2009.

9)渡部匡史、鈴木陽一、宮澤正顯、小柳義夫: Rho GTPase family による HIV-1 複製抑制。第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009.

10) 小柳義夫、佐藤佳: HIV 感染におけるテトラスパニンの意義。第82回日本生化学会大会、1S9p-3、神戸、2009.

12)佐藤佳、山元誠司、三沢尚子、小柳義夫: 異種動物細胞株を用いたヒト BST-2/Tetherin の機能比較研究。第23回日本エイズ学会学術集会、O62-335、名古屋、2009.

11)高濱正吉、澤崎達也、岡山明子、赤木達也、遠藤弥重太、山本直樹、梁明秀: 細胞極性制御キナーゼ aPKC による HIV-1 Gag のリン酸化及びその生理的意義。第23回日本エイズ学会学術集会・総会、平成21年11月26~28日、名古屋国際会議場、名古屋。

12)田中勇悦、児玉晃、張麗峰、田中礼子: エイズ制御を目的とする樹状細胞(DC)免疫: DCの簡単培養法とヒト化マウスでの評価。日本エイズ学会誌 第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年、愛知県。

13)田中礼子、田中勇悦: OX40 共刺激を介する活性化 PBMC での CCR5 HIV-1 の感染抑制。日本エイズ学会誌 第23回日本エイズ学会学術集会・総会、2009年、愛知県。

14)血中 HIV 量の異なる慢性期 HIV 感染者における末梢血単核球の液性因子産生能と各細胞分画の性状解析。中山香、立川(川名)

愛、藤井毅、鯉淵智彦、小田原隆、岩本愛吉。
第 57 回日本ウイルス学会学術集会、東京
2009 年 10 月。

15) 日本人集団における HIV 特異的細胞性
免疫応答の解析。立川(川名)愛、中山香、
古賀道子、鯉淵智彦、小田原隆、藤井毅、岩
本愛吉。第 23 回日本エイズ学会学術集会。
名古屋 2009 年 11 月。

16) 中山英美、前川彦一郎、宮本 直、塩田達雄
HIV 感染抑制因子 TRIM5 α の感染抑制機構の解
析 第 57 回日本ウイルス学会総会、東京、2009
年 10 月

17) 河野 健、塩田達雄、中山英美 旧世界ザル
抗 HIV 因子 TRIM5 α の種決定領域の解析 第
57 回日本ウイルス学会総会、東京、2009 年 10
月

18) 中山英美、前川彦一郎、宮本 直、塩田達雄
HIV 感染抑制因子 TRIM5 α の感染抑制機構の解
析 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古
屋、2009 年 11 月

19) 高橋秀宗、飛梅実、金子恵子、佐多徹太郎。
HIV-1 中和抗体を誘導する抗原開発 第 57 回
日本ウイルス学会総会、東京、2009 年 10 月

20) 高橋秀宗、佐多徹太郎。HIV-1 中和抗体を
誘導する抗原開発。第 13 回ワクチン学会総
会、札幌、2009 年 9 月。

21) 森正彦 有吉紅也：タイ国 HIV-1 CRF01_
AE 感染長期未発症者における新たな HLA 拘
束性 Gag エピトープの同定、第 83 回日本感染
症学会総会、東京、2009 年 4 月

22) 土屋菜歩 Pathipvanichi P, Rojanawiwat A,
Sawanpanyalert P, 有吉紅也：北タイ政府系病
院 HIV が依頼における 13 年間の診療経験—死
亡率の推移と新たな問題—第 23 回日本エイズ
学会学術集会・総会、名古屋市 2009 年 11 月

23) 小山貴芳、孫 賓蓮、峯本 譲、徳永研三、
佐多徹太郎、石坂幸人。HIV-1 が誘導する宿主
DNA 二重鎖切断はマクロファージへの感染効
率を上昇させる。第 57 回日本ウイルス学会総
会、東京、2009 年 10 月

24) Ahmed, N., Hayashi, T., Hasegawa, A.,
Furukawa, H., Okamura, N., Chida, T., Masuda, T.,
and Kannagi, M. Effects of commensal organisms

on HIV-1 replication in macrophage-like cells. 第
23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古屋
市 2009 年 11 月

25) 増田貴夫、西辻裕紀、高橋卓也、林隆也、
宮野正史、長谷川温彦、神奈木真理。HIV-1 イ
ンテグラーゼと宿主因子 HIV-1 インテグラー
ゼの逆転写過程への直接関与とその作用機序。
第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会、名古
屋市 2009 年 11 月

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

II. 分担研究報告書

感染病態を制御する宿主抗ウイルス蛋白と それを標的とする HIV-1 蛋白の機能解析

研究分担者 徳永 研三 国立感染症研究所 感染病理部 主任研究官
研究協力者 岩部 幸枝 国立感染症研究所 感染病理部 エイズ予防財団 RR

研究要旨：APOBEC3 及び TRIM5 α に続いて先頃同定された抗ウイルス宿主因子 BST-2/tetherin (以下 BST-2) はウイルス粒子放出を抑制する膜蛋白である。HIV-1 Vpu はその機能を阻害してウイルス粒子放出を促進するアクセサリー蛋白であるが、その作用機序は不明である。本年度の研究では、BST-2 が Vpu 発現により細胞表面から消失し細胞内で分解を受けるメカニズムを解明することを目的とした。まず Vpu と BST-2 の相互作用に関わる責任領域の同定を試みるべく、他の膜蛋白とのキメラを作製して実験を行った結果、両者が膜貫通領域で相互作用していることを明らかにした。また Vpu による BST-2 細胞内分解経路についてライソゾーム阻害剤またはプロテアソーム阻害剤を用いて検討したところ、Vpu が BST-2 をライソゾーム分解へと導くことを見出した。更に Vpu が細胞内のどのコンパートメントで BST-2 を標的とするかについて検討した結果、Vpu は細胞表面上の BST-2 をエンドサイトーシスにより細胞内に internalize させることが判明した。こうした Vpu の機能が宿主因子 β TrCP に部分的に依存することも明らかになった。

A. 研究目的

宿主が HIV-1 に対して自然免疫として備えている抗ウイルス蛋白としてこれまで APOBEC3 (3G 及び 3F) と TRIM5 α が報告されてきた。が、後者はサル型だけが HIV-1 複製抑制効果を示すことから、ヒトが本来備えている抗ウイルス蛋白として判っていたのは前者のみであった。が、2008 年に Neil ら (Nature, 2008. 451:425-30) が BST-2 として知られる膜蛋白が HIV-1 の細胞外放出を抑制する抗ウイルス因子であることを見出し、これを tetherin と命名した (以下 BST-2)。APOBEC3G が HIV-1 アクセサリー蛋白 Vif によりその機能が阻害されるのと同様、BST-2 は同じくアクセサリー蛋白である Vpu により不活化される。Vpu は 81 アミノ酸からなるリン酸化膜蛋白で、ウイルス粒子には取り込まれないことから、その機能はウイルス産生細胞で完結していると言われる。実際、Vpu は感染後期においてのみウイルス複製における二つの役割を担っている。一つは、小胞体において HIV-1 エンベロープ前駆体 gp160 をトラップしている CD4 と相互作用し、ユビキチンライゲース複合体サブユニットである

β TrCP-1 及び β TrCP-2 依存的に、CD4 をプロテアソーム分解に持ち込むことである。二つ目は、Vpu が細胞種依存的にウイルス粒子の放出を促進することであるが、CD4 分解機能に比べると、この機能についてはこれまで殆ど解析が進んでいなかった。前述の Neil らの報告により、Vpu が抗ウイルス蛋白 BST-2 の機能を妨害することによって、ウイルス放出効率を高めることが判明し、更に Van Damme ら (Cell Host Microbe, 2008. 3:245-52) により、Vpu が BST-2 の細胞表面発現レベルを低下させていることが明らかになった。だがそのメカニズムはいまだ不明である。本年度、我々は Vpu が BST-2 を不活化する作用機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1. 発現プラスミド DNA の構築

HIV-1 Env 変異体プロウイルス DNA である pNL-E- の Vpu 開始コドンに HpaI サイトを導入した Vpu/Env 変異体、または Vpu の 52/56 番目のセリンをアラニンに置換した β TrCP 結合不全変異体 2/6 を構築した。次に pNL-43 を鋳型

に Vpu 遺伝子の PCR 増幅・制限酵素処理を行い、Rev-responsive element (RRE) を挿入した哺乳類細胞発現ベクター pCAGGS-RRE、pCAGGS-HA-RRE または pCAGGS-EGFP-RRE に挿入した。作製した Vpu-RRE 発現ベクターをベースに β TrCP 結合不全 Vpu 変異 Env 変異体 2/6 を、細胞内領域 (CT) 欠失変異体を、または CD4 膜貫通領域 (TM) と交換したキメラを構築した。HeLa、Molt-4、293T 細胞由来 RNA を鋳型にそれぞれ BST-2、 β TrCP-1 及び-2、dynamain-2 (Dyn2) の cDNA 合成及び PCR 増幅・制限酵素処理を行い、それぞれ pCAGGS、pCAGGS-FLAG、pCAGGS-EGFP に挿入した。作製した BST-2 発現ベクターをベースに、細胞外ドメイン FLAG または Myc タグ版 BST-2 ベクターを、またエンドサイトーシス不全変異体 Y6A/Y8A を、更に二型膜蛋白である Transferrin receptor (TfR) の CT 及び TM とのキメラを、BST-2 CT/TM を CD4 signal peptide と交換したキメラを、または GPI アンカーシグナル欠失変異体を構築した。C 末 EGFP タグ付き Dyn2 発現ベクターをベースに dominant-negative 変異体 K44A を作製した。また β TrCP-1 及び-2 に対する shRNA レンチベクターも作製した。

2. ウイルス産生アッセイ

BST-2 発現ベクター、Vpu-RRE 発現ベクター、Rev 発現ベクター、そして Vpu/Env 変異体プロウイルス DNA pNL-U-E を FuGENE 6 (ロシュ社) を用いて 293T 細胞にコトランスフェクションした。48 時間後に培養上清を回収して、HIV-1 p24 ELISA Kit (Advanced BioScience Laboratories 社) によりウイルスの定量を行った。細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定することによりトランスフェクション効率を調べた。あるいは、Env 変異体、Vpu/Env 変異体、または β TrCP 結合不全 Vpu 変異 Env 変異体 2/6 を水疱性口炎ウイルス G 蛋白発現ベクターと共に 293T 細胞にコトランスフェクション、48 時間後に培養上清を回収して p24 の定量を行った後 HeLa 細胞に感染、16 時間に洗浄、更に 24 時間後に上清を回収して、産生されたウイルスを定量した。

3. 免疫沈降法

BST-2 発現ベクター (実験により CD4 発現ベクターを使用)、Vpu-RRE 発現ベクター (野

生型または 2/6 変異体)、Rev 発現ベクターを (実験により更に β TrCP-1 または-2 発現ベクターを追加) 293T 細胞にコトランスフェクションした。48 時間後に細胞溶解液を加えて遠心した上清を用いて、抗 BST-2 抗体 (あるいは抗 CD4 抗体) による免疫沈降反応を行った。沈降物を用いたウエスタンブロットにより、BST-2/Vpu/ β TrCP または CD4/Vpu/ β TrCP の相互作用を検討した。

4. フローサイトメトリー

FLAG タグ BST-2、Vpu-RRE、Rev、EGFP 発現ベクターを (実験により更に Dyn2 野生型または dominant-negative 変異体を追加) 293T 細胞にコトランスフェクションした。48 時間後に抗 FLAG 抗体を用いて CyFlow (Partec 社) によるフローサイトメトリーを行った。

5. 間接蛍光抗体法

直径 13mm のグラスカバースリップ (ヌンク社) 上の COS7 細胞に野生型及びキメラ Vpu-EGFP-RRE (実験により HA タグ付き Vpu-RRE)、Rev、Myc タグ付き野生型及びキメラ BST-2 発現ベクターを (実験により更に EGFP-Dyn2 野生型または dominant-negative 変異体を追加) トランスフェクションした。24 時間後に 4% パラフォルムアルデヒド固定、0.05% サポニン処理後、抗 Myc モノクローナル抗体 (シグマ社) で一次抗体処理 (実験により抗 HA ポリクローナル抗体 (シグマ社) 使用)、Cy3 または Cy5 標識抗マウス抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratory 社) で二次抗体処理して、DMRB 顕微鏡 (ライカ社) により観察した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験は、国立感染症研究所・組換え DNA 実験安全委員会において平成 20 年 4 月 30 日付け承認番号・機 20-16 により、また大臣確認 (平成 20 年 10 月 21 日、国文科振第 31 号、感染研承認番号 大 20-10) により、承認を得たプロトコールに従って行われた。

C. 研究結果

1. Vpu による BST-2 のライソゾーム分解

我々はまず Vpu が BST-2 の細胞表面発現を減少させるか否かを確認した。フローサイトメ

トリー及び細胞表面/細胞内二重染色蛍光抗体法により Vpu の有無による BST-2 の発現変化を調べた結果、確かに BST-2 の細胞表面発現レベルは Vpu により低下した。この結果より、Vpu により細胞表面 BST-2 あるいは細胞内 de novo BST-2 が downregulate されライソゾーム分解される可能性、または de novo の BST-2 が CD4 同様に Vpu によってプロテアソーム分解系の小胞体関連分解を起こしている可能性が考えられた。そこでライソゾームプロテアーゼ阻害剤のカクテルを用いた蛍光抗体法を行った。その結果、Vpu 発現下でのみライソゾームマーカーであるカテプシン D と BST-2 の共局在が認められた。一方、プロテアソーム阻害剤添加によって Vpu 及び BST-2 非依存的なウイルス産生性の低下が認められた。これは恐らく細胞内ユビキチンの枯渇により、budding 時に必要なユビキチン要求性宿主蛋白 ESCRT ファミリーが機能不全となるためと推察される。以上より、Vpu 自身は BST-2 をライソゾーム分解経路へ導くことが明らかになった。

2. Vpu の BST-2 分解における β TrCP の関与

Vpu が CD4 を小胞体関連分解する際には、ユビキチンライゲース複合体のサブユニットである β TrCP-1 及び-2 依存的に CD4 をプロテアソーム分解し、また β TrCP-1 及び-2 はライソゾーム分解にも関与することが知られている。そこで我々は Vpu による BST-2 の分解が β TrCP-1 及び-2 に依存するか否かを検討した。免疫沈降法を試みた結果、Vpu は BST-2 及び β TrCP-1 または-2 と相互作用し 3 重複合体を形成することが判った。また β TrCP 結合不全 Vpu 2/6 変異型 VSV-G シュードウイルスを感染させた HeLa 細胞からの HIV-1 産生効率は野生型の半分程度に低下しており、更に β TrCP-1 及び-2 をノックダウンした HeLa における野生型のウイルス産生効率は、2/6 変異ウイルスとほぼ同程度になったことから、Vpu はウイルス放出促進能において β TrCP を partial に要求することが明らかになった。

3. Vpu による細胞表面 BST-2 の internalization

次に、Vpu が標的とするのは細胞表面 BST-2 か或いは細胞内の de novo BST-2 かを明らかにする為、dominant-negative Dyn2 によるエンドサイトーシス阻害が、Vpu による BST-2 の細胞

表面発現レベルの低下を抑制するか否かを検討した。フローサイトメトリー及び二重染色蛍光抗体法を行った結果、dominant-negative Dyn2 発現細胞において、Vpu により抑えられていた BST-2 の細胞表面発現が回復することが判明した。更に Vpu がエンドサイトーシス不全 BST-2 変異体の細胞表面発現を downregulate できたことから、Vpu が積極的に細胞表面 BST-2 を internalize している可能性が示唆された。

4. Vpu と BST-2 の相互作用におけるそれぞれの責任領域の同定

Vpu と BST-2 の相互作用における、BST-2 側の責任領域をまず決定すべく、BST-2 の TIR の CT 及び TM とのキメラを作製して、免疫沈降法及びフローサイトメトリーを行った。その結果、BST-2 の TM が TIR 由来の時のみ、Vpu との相互作用がなくなり、Vpu 耐性、即ち Vpu 存在下でも BST-2 の細胞表面からの downregulation は認められなくなった。次に Vpu 側の責任領域を同定する為、Vpu の CT 欠失変異体を、または CD4 TM と交換したキメラを作製して免疫沈降法を行ったところ、CT 欠失変異体は BST-2 との相互作用能を維持していたのに対し、CD4 TM キメラはそれを失った。以上のことから、Vpu と BST-2 は TM-TM 間で相互作用していることが明らかになった。

5. BST-2 の抗ウイルス機能とトポロジーの関係

BST-2 が細胞膜上でどのようにウイルス粒子をトラッピングするかについて検討する為、C 末側のみで細胞膜に留まる BST-2/CD4 signal peptide キメラ、またはその逆に N 末側のみで留まる GPI アンカーシグナル欠失変異体を構築し、ウイルス産生アッセイを行った。その結果、どちらの変異型 BST-2 もウイルス産生抑制能を失った。従って、BST-2 の抗ウイルス活性には、BST-2 が N 末と C 末の両方で細胞膜に留まる必要があることが明らかになった。

D. 考察

本年度は、どのようなメカニズムで抗ウイルス宿主蛋白 BST-2 が HIV-1 アクセサリー蛋白 Vpu により細胞表面から消失させられ細胞内で分解を受けるかについて解明することを目的とした。まず Vpu が BST-2 をどの分解経路

に導くかについて、ライソゾーム阻害剤を用いた実験を行った結果、ライソゾーム分解経路により BST-2 が Vpu によって不活化されることが明らかになった。Vpu による BST-2 のライソゾーム分解については、米国の 2 つのグループも先頃の論文 (Mitchell et al., PLoS Pathog., 2009. 5: p. e1000450, Douglas, J.L., 2009. J. Virol. 83:7931-47) で同様の結論を出している。Vpu のウイルス放出促進における β TrCP-1 及び-2 依存性については、CD4 の小胞体関連分解における程の絶対性はなく、partial な依存性が認められるのみであった。この結果より 1) Vpu が未知の宿主因子を利用して BST-2 をライソゾーム分解へ導く。2) Vpu が BST-2 以外の未知の宿主抑制因子を不活化する。という 2 つの可能性が示唆された。Mitchell ら (PLoS Pathog., 2009. 5: p. e1000450) は、physiological にエンドサイトーシスされた BST-2 を Vpu が標的にして、ライソゾーム分解へ導くことを報告したが、我々はエンドサイトーシス全般を阻害する dominant-negative Dyn2 を用いた実験において、Vpu で抑制される BST-2 の細胞表面発現が回復することから、Vpu は細胞表面 BST-2 を標的にして internalize すると結論付けた。また米国の複数のグループは先頃、Vpu が BST-2 の TM と相互作用することを報告した (Goffinet et al. 2009. Cell Host Microbe 5:285-97, McNatt et al. 2009. PLoS Pathog 5:e1000300, Ronget et al. 2009. J. Virol. 83:7536-46. 他)。しかしながら、それらの論文においては、ヒト型と他の霊長類型 BST-2 とのアミノ酸配列の違いを基にした点変異体による実験結果により BST-2 の TM が重要であるとしている為、CT が二次的に Vpu との相互作用に関与する可能性を否定できない。一方、我々は、BST-2 の CT を TfR のそれと完全に置換したキメラ型でも Vpu との相互作用が認められること、更に Vpu 側の責任領域も TM であること、を見出したことにより、今回初めて、Vpu と BST-2 の TM-TM 間相互作用を証明するに至った。最後に我々は、N 末のみ或いは C 末のみで細胞膜にアンカーする BST-2 変異体を用いて抗ウイルス活性を検討した結果、片側のみのアンカリングでは BST-2 はその抗ウイルス活性を失うことを見出した。このことから、我々は、BST-2 の N 末か C 末

のどちらかが細胞膜側に、その反対側がウイルス膜側に突き刺さって、BST-2 が二量体を形成しつつ両者の橋渡しをしてウイルス粒子をトラッピングする、という BST-2 のトポロジーモデルを提唱する。

E. 結論

1. Vpu は BST-2 をライソゾーム分解経路に導く。
2. Vpu による BST-2 のライソゾーム分解には β TrCP-1 及び-2 が partial に関与する。
3. Vpu は細胞表面 BST-2 を標的とし細胞内に internalize する。
4. Vpu と BST-2 は TM-TM 間で相互作用する。
5. BST-2 の抗ウイルス活性には、BST-2 が N 末と C 末の両方で細胞膜にアンカリングする必要がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

論文発表

- 1) Jinnopat, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Utachee, P., Kitagawa, Y., Chandimal de Silva, U., Siripanyaphinyo, U., Kameoka, Y., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Impact of Amino Acid Variations in Gag and Protease of Human Immunodeficiency Virus Type 1 CRF01_AE strains on Drug Susceptibility of Virus to Protease Inhibitors. **J. AIDS.** 52:320-8.
- 2) Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K (corresponding author). HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. **J. Biol. Chem.** 284: 35060-72. 2009.
- 3) Utachee, P., Nakamura, S., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., Auwanit, W., and Kameoka, M. Two N-linked glycosylation sites in V2 and C2 regions of