

human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 regulate viral neutralization susceptibility to the human monoclonal antibody specific for CD4 binding domain. *J. Virol.* *In press.*

学会発表

- 1) 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.
 - 2) 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.
 - 3) 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.
 - 4) 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.
 - 5) 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. 10.
 - 6) 池田輝政、徳永研三、佐多徹太郎、原田信志、小糸厚 : 哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント LINE-1 の阻害. 第 57 回日本ウイルス学会総会 (東京) 2009. 10.
 - 7) 志村まり、前島一博、網蔵玲子、岩渕万里、徳永研三、今本尚子、佐多徹太郎、瀧澤俊博、大隅圭太、石坂幸人 : HIV-1 感染細胞での核膜制御. 第 82 回日本生化学会大会 (神戸) 2009. 10.
 - 8) 池田輝政、徳永研三、佐多徹太郎、原田信志、小糸厚 : 哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント阻害. 第 32 回日本分子生物学会 (横浜) 2009. 12.
 - 9) 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 : BST-2/Tetherin と HIV-1 Vpu の相互作用における結合領域の同定. 第 32 回日本分子生物学会 (横浜) 2009. 12.
 - 10) Kenzo Tokunaga, Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Yukihito Ishizaka, Yoshitaka Tanaka, and Tetsutaro Sata. : HIV-1 Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin and leads it to lysosomes partially in a β TrCP-dependent manner. 第 32 回日本分子生物学会 (横浜) 2009. 12.
 - 11) 志村まり、前島一博、網蔵玲子、岩渕万里、徳永研三、今本尚子、佐多徹太郎、瀧澤俊博、大隅圭太、石坂幸人 : HIV-1 感染細胞での核膜制御. 第 32 回日本分子生物学会 (横浜) 2009. 12.
 - 12) 小山貴芳、徳永研三、佐多徹太郎、石坂幸人 : レンチウイルスベクターをヒトゲノムの特定領域に挿入させる技術の開発. 第 32 回日本分子生物学会 (横浜) 2009. 12.
 - 13) Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Masanobu Kinomoto, Keiko Kaneko, Yukihito Ishizaka, Yoshitaka Tanaka, Tetsutaro Sata, and Kenzo Tokunaga (presenter): The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010). San Francisco, USA, 2010. 2.
 - 14) Ikeda, T., Tokunaga, K., Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Harada, S., Heidmann, T., and Koito, A. Intrinsic Restriction Activity by APOBEC1 against the Mobility of Autonomous Retrotransposons: The 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2010). San Francisco, USA, 2010. 2.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他
なし

マクロファージ感染に関与する宿主因子の同定

研究分担者 石坂 幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部 部長

研究要旨：潜伏感染病態で重要な役割を担うマクロファージ(M ϕ)への HIV-1 感染機序と潜伏感染細胞からのウイルス再産生機序の解析を行った。静止 M ϕ への HIV-1 感染の際、ゲノム DNA 二重鎖切断(DSB: DNA double strand breaks) がウイルス感染において「正」に作用する事、DSB サイトにウイルス DNA が挿入されることまた、DSB へのウイルス DNA の挿入はインテグラーゼの活性非依存的に生じる可能性が示唆された。一方、アクセサリ遺伝子である Vpr が自然免疫シグナルを惹起することで、ウイルス再産生を誘導する機序の全貌を明らかにした。Vpr は DSB 誘導能を示す事また、患者血中に Vpr が存在することも明らかになっており、Vpr が患者体内における潜伏感染病態において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

A. 研究目的

Antiretroviral therapy が導入され、HIV-1 陽性症例の予後が劇的に改善された。しかし近年の研究からウイルスを体内から駆逐することは困難であることが分かり、潜伏感染病態の理解と治療法の開発が重要となっている。本分担研究では、潜伏感染状態で重要な役割を担う単球/マクロファージ (M ϕ) 系細胞を中心としたウイルス感染とウイルス再産生機序の2つの柱を設定し、解析した。

近年、ウイルス感染の際にゲノム DNA 二重鎖切断 (DSB: DNA double-strand breaks) が誘導されること、また DSB によって惹起される細胞側のシグナルを遮断することで、ウイルス感染が阻害されることが報告された。分担研究者はウイルス感染の際に DSB が惹起されることを見出すとともに、アクセサリ遺伝子産物 Vpr が DSB を強く誘導することを早期から明らかにしている。Vpr は M ϕ へのウイルス感染の際に重要な役割を担っていることが知られているがその具体的な役割は明確になっていない。しかし一つの可能性として、DSB が静止マクロファージへのウイルス感染効率の上昇に寄与している事を考え、この可能性を明らかにすることを本研究の第一目標とした。

一方、これまでの研究成果として、HIV-1 感染患者血液中に nM オーダーの Vpr が存在することまた、同程度の濃度のリコンビナント Vpr

蛋白質(以下 rVpr)を潜伏感染細胞である U1 細胞に添加するとヒト末梢血単核球細胞(以下 PBMC)依存的にウイルス再産生が誘導されることが分かった。そして、この現象が M ϕ からの IL-6 産生を介して誘導されることも見いだしている。この知見を背景に今年度は IL-6 の産生機序の全貌を明らかにした。

B. 研究方法

1) X線照射によるウイルス感染効率の上昇

DSB の感染における役割を明らかにするため、ウイルス感染と並行して、2.5 Gy の X 線照射を行った。感染2日後の M ϕ から DNA を抽出し、Alu-PCR 法による解析に供した。また、DSB により惹起される細胞内シグナルの関与を明らかにする目的で、DNA 損傷シグナルの最も上流で機能する PI-3 キナーゼ ATM (Ataxia telangiectasia mutated) に対する阻害剤 (KU55933) を添加し、X 線照射後の挿入効率の上昇に与える影響を調べた。また、DSB の意義を明らかにするため、静止 M ϕ と培養細胞株に対する作用を比較した。

2) DSB サイトが持つウイルス DNA のゲノム挿入過程における役割

DSB サイトのウイルス挿入における役割を調べるため、酵母ゲノム DNA 由来 18 塩基を認識する制限酵素サイトと制限酵素を組み合わせ

たウイルス感染システムを構築した。使用した制限酵素サイトは I-SceI (以下 SceI) で、ヒトゲノム中には存在しないことが知られている。まず、ヒト単球性白血病細胞株である THP-1 に SceI サイトを含むプラスミド DNA を導入し、ゲノムに組み込まれた細胞株 (THP1/SceI) を 2 クローン得た。フォルボールエステルである PMA を処理する事で THP-1/SceI を静止 M ϕ 様細胞にした後、アデノウイルスを用いて SceI を強制的に発現させるのと並行して HIV-1 ウイルスを感染させた。感染後の細胞由来 DNA について nested-qPCR を行い、SceI サイト近傍に組み込まれたウイルス DNA のコピー数を半定量した。DNA コピー数の検定は Taqman probe とリアルタイム PCR (ABI 社製) を使用して行った。また、独立した感染実験を複数回行い、プロウイルス DNA とゲノム DNA との境界点 (以下ブレイクポイント) を含む DNA を PCR 増幅し、クローニング後シーケンス解析を行った。

3) rVpr による IL-6 産生機序の解明

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

4) 酸化型フォスファチジルコリンの産生と

IL-6 産生誘導

近年、ミトコンドリアの機能異常によって活性酸素が産生されることにより、細胞膜上に存在するフォスファチジルコリンが酸化型となり (Oxidized phosphatidylcholine, OxPC)、自然免疫系受容体の 1 つである Toll-like 受容体 -4 (以下 TLR4) の活性化を介して細胞内シグナルを惹起することが報告された。これまでの解析で rVpr の作用によるミトコンドリア機能異常とこれによって誘発される活性酸素の産生によって MAP キナーゼ (MAPK mitogen-activated kinase) の活性化や IL-6 産生が誘導されることを見いだしていたが、TLR4 活性化の誘因は明確でなかった。そこで今回、昭和大学薬学部 板部洋之教授との共同研究として、OxPC に対する単クローン抗体 (DLH3, IgM 抗体) を用いて rVpr 誘発 TLR4 活性化における OxPC の関与の有無を明らかにすることを試みた。方法としては、細胞に rVpr を作用させる前処置として、5 nM の濃度で DLH3 を作用させ、IL-6 産生の有無を qRT-PCR 法によって解析した。また TLR4 のアダプター分子である MyD88 や MAPK の基質である C/EBP- β の内在性遺伝子産物の役割を明らかにすることを目的に、それぞれの mRNA に対して合成した siRNA を導入することで、発現を人工的に減少させ、その前後での IL-6 産生能の変化を観察した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用する遺伝子組み換え生物等の第二種使用等に関する拡散防止措置は 18 国文部科学省令第 45 号「マクロファージへの HIV-1 感染阻止化合物の探索研究」として平成 19 年 4 月 13 日付け、文科省大臣により確認承認されている。本研究課題は「後天性免疫不全症候群 (AIDS) における Vpr の臨床的意義の解明」に関する研究として、国立国際医療センター倫理委員会での承認を得た。

C. 研究結果

1) X-線照射によるウイルス感染効率の上昇

X-線照射により、ウイルス DNA のゲノムへの挿入頻度が 30 倍以上増加した。X 線照射によるウイルス DNA コピー数の増加は、静止 M ϕ のみ観察され、分裂細胞である HT1080 (ヒト

線維肉腫細胞株)では全く認められなかった。そして、静止 Mφでの DSB によるウイルスコピー数の増加は、感染後 5 時間目の X-線照射で最も顕著に認められ、感染後 3 時間または 7 時間での照射では効果が弱かった。さらに、ATM 阻害剤によって挿入効率の上昇は完全に抑制された。

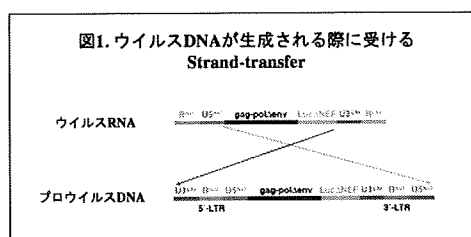
2) DSB サイトへのウイルス DNA の挿入

HIV-1 を感染させる際に SceI を発現させることで、ゲノム中の SceI サイトまたはその近傍へのウイルス DNA の頻度が上昇した。コントロールとして使用した LacZ 発現ウイルス感染群では、同サイト近傍へのウイルス挿入は検出されなかった。

次に SceI 部位にウイルス DNA が挿入されることを検証するため、ブレイクポイントを挟む形で設定したプライマーを用いて感染細胞由来 DNA から PCR にて DNA を増幅した。その結果、SceI アデノを感染させた群 12 検体中 10 個に増幅が認められ、LacZ アデノ感染群では認められなかった。この際、KU55933 を添加すると増幅される検体数は 2 個に減少し、ATM 依存的に DSB サイトにウイルス DNA が挿入されることが示された。

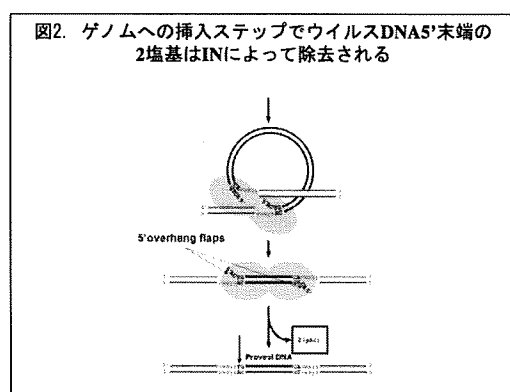
さらに組み込まれた DNA をクローニングし、塩基配列を決定したところ、確かに SceI サイト内にウイルス DNA が挿入されていることが確認された。

本研究で使用しているウイルス DNA は pNL4-3 であり、5' 側に NY5 株、3' 側に LAV 株由来ウイルスゲノムを有するキメラの構造を有する。逆転写酵素によってウイルス DNA が産生される際、strand-transfer という現象が生じ、最終的に生成されるウイルス DNA は 5' 側に LAV、3' 側に NY5 株の配列になることが知られている(図 1)。SceI に挿入されたプロウ



イルス DNA の塩基配列を解析したところ 5' 側に LAV 株、3' 側に NY5 株に由来する塩基配列を認め、通常の如く strand-transfer を経てウイルス DNA が生成され、これが SceI 部位に挿入されていることが分かった。

一方、ウイルス DNA はインテグラーゼ(以下 IN: integrase)の機能によって「processing-joining-repair」の 3 つからなる修飾を受けながらゲノムに挿入されることが知られている(図 2)。そして、ウイルス DNA の 5' 末端の 2 塩基は「joining」のステップで 5'-overhang flap が形成され、結果として除去される(図 2)。



即ち、ウイルス DNA は合成初期に 5' 末端に認められる 2 つの塩基(アデニンとシトシン、以下 pAC)は、挿入過程で除去され、ゲノムに挿入されたプロウイルス DNA はこの 2 塩基を欠失している。

SceI サイトに挿入されたプロウイルス DNA の 5' 末端を解析したところ、10 個中 8 個のクローンで pAC が温存されていた。即ち、DSB サイトへのウイルス DNA の挿入は、IN の catalytic activity 非依存的に誘導される可能性が示唆された。

3) rVpr による IL-6 産生機序の解明

これまでの解析で、10 ng/ml (約 0.6 nM) の rVpr による IL-6 産生には MAPK や IKK が関与していること、TLR4 の下流で機能するアダプター分子、MyD88 が関与していることも明らかになっていた。さらに rVpr によってミトコンドリア膜電位の低下が誘導され、活性酸素のスカベンジャーである N-acetylcysteine (NAC) の添加によって IL-6 産生が抑制されることから、rVpr 作用の上流には活性

酸素による細胞側変化が重要な役割を担っている可能性が強く示唆されていた。しかし、この活性酸素産生が次にどのような細胞反応を惹起するかに関する糸口を見いだすことができなかった。そんな中 2008 年、SARS-CoV による重症化機序の解析により、ウイルス感染に伴って生じる活性酸素が OxPC 産生を誘導し、これが TLR4 依存的に組織傷害性サイトカインを産生誘導するという研究成果が、欧州の研究グループから報告された。そこで、本研究でも同様の現象が関与することを考え、この可能性を検証した。

4) OxPC を介した IL-6 産生誘導

まず、rVpr の添加によって OxPC 生成される可能性を明らかにするため、rVpr 作用後の MDM(monocyte derived macrophage)を固定し、DLH3 を用いて免疫組織化学的解析を行った。その結果、確かに OxPC が産生誘導されることが確認された。

次に DLH3 を rVpr 添加 20 分前に 5 nM の濃度で作用させ、rVpr による IL-6 産生を qRT-PCR で解析した。その結果、DLH3 前処置により有意に IL-6 産生が抑制された。さらに rVpr によって誘導される TLR4 依存的 C/EBP- β のリン酸化も DLH3 の前処置によって抑制されることが分かり、rVpr による IL-6 の産生には、OxPC の生成による TLR4/MyD88-MAP 依存的な細胞内シグナル誘発の関与が明らかとなった。

D. 考察

1) DNA 損傷とウイルス感染

DNA 損傷シグナルとウイルス感染の関連性については、現在のところ一定の見解が得られていない。DSB シグナルがウイルス感染に重要であるとする報告 (Nat. Cell Biol. 7, 493, 2005; PNAS 100, 4778, 2003) と、必要でないとする報告 (J. Virol. 79, 1389, 2005; J. Virol. 79, 2973, 2005) に 2 分されている。今回、健常人由来 M ϕ に X 線照射を施すことによってウイルス DNA の挿入頻度が顕著に増加することが明らかになった。一方、分裂細胞では DSB の効果は全く検出されず、DNA 損傷のウイルス感染における意義は、専ら静止細胞でのみ認められる現象であることが示唆された。今

回の解析では M ϕ のみを使用した。静止細胞に対する影響を考慮する場合、T 細胞に対する DSB の作用も解析する必要性が考えられる。しかし一方、T 細胞は DSB に感受性が高く、容易にアポトーシスが誘導される。そのため、DSB のウイルス感染における役割を考える際、標的細胞として M ϕ を主体とした感染機序における役割を明らかにすることが重要である可能性も想像される。

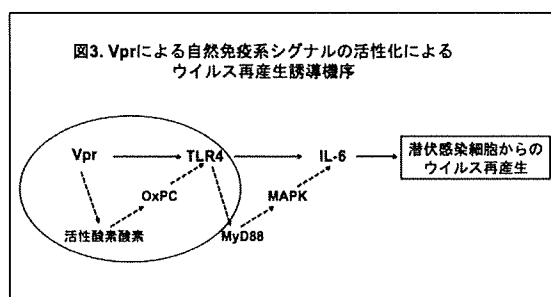
静止 M ϕ を使用したモデル実験により、DSB サイトにウイルス DNA が挿入されることが証明され、DSB サイトはウイルス DNA がゲノムへ組み込まれる際のプラットフォームとして機能することが示唆された。また、X 線照射のウイルス感染に対する効果は感染後 5 時間で最も顕著に認められた。ウイルス感染した後、合成されたウイルス DNA は感染後 6 時間目位から核の周囲に認められるようになり、ついで核内に認められるようになる。DSB のウイルス感染における効果が感染後の特定の時間に集中して認められることは、DSB が未知の宿主因子を活性化し、ウイルス DNA を積極的に DSB サイトにリクルートする可能性が示唆される。この機序については現在のところ全く未知であるが、次年度以降も解析を継続する。

一方、SceI サイトに挿入されたプロウイルス DNA の解析から、一般にウイルス DNA が合成の過程で生じる strand-transfer は DSB 依存的に挿入される DNA の場合でも生じていることが分かった。しかし、SceI サイトに挿入されたウイルス DNA の多くは、IN 作用によって誘導されるウイルス DNA 5' 末端の pAC の除去を受けていない事が判明し、DSB サイトへのウイルス DNA の挿入は、IN 非依存的に誘導される可能性が示唆された。この事を検証するため、IN の catalytic activity を欠失した D64V 変異体 (IN の 64 番目のアスパラギン酸がバリンに置換した変異体)を用いた実験を計画している。この実験は、近年多用されている IN 阻害剤の有効性、特に静止 M ϕ へのウイルス感染に対する阻害効果を考える上で、究めて重要であると考えられる。次年度以降、感染ウイルスを用いた新たな解析を行うべく、準備を開始したところである。

DSB サイトへの外来性遺伝子の挿入につい

ては、アデノ随伴ウイルスや肝炎ウイルス DNA (Nat. Genet. 36, 767, 2004; PNAS 101, 11135, 2004) を用いた解析が行われている。即ち、これらの報告と今回の解析結果は、DNA の種類に関係なく、外来性 DNA を DSB サイトに挿入させる宿主細胞機能の存在を示唆する。Vpr は DSB を誘発することも見いだしており、M μ に DSB を誘発することで、細胞内シグナルを惹起し、効率良くウイルス DNA をゲノムに組み込ませている可能性も考えられる。一方、分裂細胞では DNA 複製の過程で自然にゲノム中に「切れ目」が生じるため、改めて DSB を誘発する必要性は無い。その理由から、Vpr は分裂細胞に対して何ら機能性を示さないものと理解される。

今年度、潜伏感染細胞からのウイルスの再産生機序に関する解析をさらに進め、Vpr によって誘導される自然免疫系活性化によるウイルス再産生機序の全貌を明らかにした (図 3)。



本年度明らかにできた部分を図3の「丸」で示す。これまで、rVpr は PNMC や CD14 陽性細胞に対して IL-6 産生を誘導し、これが活性酸素阻害で阻害されること、そしてこの現象が TLR4/MyD88 依存的に生じることが分かっていた。しかし何故、TLR4 が活性化されるかに関しては不明であった。例えば、rVpr と TLR4 受容体が直接的に結合することを仮定し、ピアコアを用いて TLR4 のリコンビナント蛋白質と rVpr との結合性を解析したが、明確な結合性を認める事はできなかった。ところが 2008 年、SARS-CoV 重症化に関する研究成果として同ウイルスや H5N1 インフルエンザの作用によって誘導される活性酸素が OxPC の生成を介し

て TLR4 を活性化するという現象が報告された (Cell 133, 235, 2008)。

これまで、Vpr の作用に関して膨大な報告がなされているが、細胞内シグナルの起点となる分子機序は不明であった。特にその受容体に関する報告は全く無い。逆に Vpr の機能には、細胞側受容体は必要しないとする報告も散見される。今回の解析結果は、Vpr 機能を理解する上で究めて重要な情報となる。

患者血清中に Vpr が存在し、Vpr の検出と血中ウイルス価との関連性も示唆されている。rVpr が SARS-CoV や H5N1 と同様の作用を宿主細胞に誘導することから、Vpr が生体内で組織障害作用する可能性が強く示唆される。今後、血中 Vpr をモニターすることでエイズ病態の理解がより正確に行い得る可能性も考えられる。

E. 結論

ウイルス DNA の染色体への挿入の過程に DSB と DSB 誘発細胞内シグナルが「正」の因子として作用していることが明らかになった。さらに DSB サイトへのウイルス DNA の挿入の際、IN 活性を必要としない可能性も示唆された。今後、Vpr による DSB 誘発機序と DSB へのウイルス DNA の挿入機序を明らかにする事が重要である。

一方、潜伏感染細胞からのウイルス産生誘導に関する IL-6 産生は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、さらにこのシグナルの活性化には OxPC の生成が関与していることを明らかにした。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwabu Y, Fujita H, Kinomoto M, Kaneko K, Ishizaka Y, Tanaka Y, Sata T, 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.

- 2) 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. In press.

2. 学会発表

- 1) Takayoshi Koyama, Binlian Sun, Chikako Nakai-Murakami, Yuzuru Minemoto, Shigeki Hoshino, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka. Facilitated integration of HIV-1 DNA into sites of DNA double-strand breaks; application for improved gene therapy by site-specific integration of exogenous DNA. The 4th German-Japanese HIV-Symposium. Bochum, Germany, March, 2009.
- 2) Yukihito 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.
- 3) 志村まり、前島一博、網蔵玲子、岩淵万里、徳永研三、今本尚子、佐多徹太郎、滝澤俊博、大隅圭太、石坂幸人. Nuclear envelope disorder caused by HIV-1 infection. 日本分子生物学会、2009年、横浜.
- 4) 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. 本ウイルス学会、2009年、東京.

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
3. その他
なし

HIV 感染阻害効果を示す宿主因子の構造機能相関

研究分担者 塩田 達雄 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：以前、我々は、カニクイザルの HIV 感染阻害因子 TRIM5 α はウイルスカプシドの 120 番目のアミノ酸が P である HIV-2 株の感染を阻害できるが、Q 又は A である株は阻害できない事を見出して報告してきた。本研究では、カニクイザルと近縁のアカゲザルの TRIM5 α の HIV-2 感染阻害効果を検討した。その結果、意外なことにアカゲザル TRIM5 α はカニクイザル TRIM5 α とは異なり、120 番目に Q を持つ HIV-2 株の感染も阻害可能であった。アカゲザルとカニクイザルのキメラ TRIM5 α を作製してアカゲザル TRIM5 α のより広範な HIV-2 感染阻害能の決定基を探索したところ、カニクイザル TRIM5 α の SPRY 領域の種間で配列や長さにも多型が認められる variable region 1 (V1) の 1 アミノ酸をアカゲザル TRIM5 α の対応する 3 アミノ酸と交換するだけで、アカゲザル TRIM5 α の広範な HIV-2 感染阻害能がカニクイザル TRIM5 α に付与されることが明らかになった。また、ヒヒ TRIM5 α の HIV-2 感染阻害についても調べた所、ヒヒ TRIM5 α の V1 領域はアカゲザルと同様に広範な HIV-2 感染阻害能をカニクイザル TRIM5 α に付与したが、V2 領域のヒヒ TRIM5 α 特異的な 1 アミノ酸置換が全体としてヒヒ TRIM5 α の HIV-2 感染阻害能を低下させている事が明らかとなった。SPRY 領域の 3 次元構造予測の結果、V1 と V2 は分子の同一面に位置しており、V1 と V2 の組み合わせがウイルスカプシドの認識に重要であると考えられた。

A. 研究目的

旧世界ザルの持つ抗 HIV 因子の 1 つに TRIM5 α が挙げられる。TRIM5 α は細胞質内に存在し、侵入してきたウイルスのカプシドを認識し、感染を阻害すると考えられている。我々は以前、カニクイザル TRIM5 α は HIV-2 カプシドタンパク質の 120 番目アミノ酸がプロリンの株の感染を阻害できるがグルタミン又はアラニンの株の感染を阻害できない事を見出して報告して来た。本研究では(1)カニクイザルと近縁のアカゲザルと(2)カニクイザルと同様に HIV-2 が感染して増殖すると報告されているヒヒの TRIM5 α について、それぞれ HIV-2 に対する感染阻害効果の詳細を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

(1)カニクイザルとアカゲザルの TRIM5 α 、およびアカゲザルとカニクイザルのキメラ TRIM5 α (2)ヒヒとカニクイザルのキメラ TRIM5 α を、ヒヒの T 細胞株 MT4 及び CEM-SS にセンダイウイルスベクターを用いて導入した。導入 9 時間後、カニクイザル TRIM5 α が阻害できる HIV-2 GH123 株及び阻害できない HIV-2 GH123/Q 株を感染させた。そして HIV-2 感染 1、3、6 日後の培地上清中のウイルス量を ELISA 法によって測定した。

C. 研究結果

(1)アカゲザル TRIM5 α はカニクイザル TRIM5 α と同様に HIV-2 GH123 株の感染を阻害した。意外なことにアカゲザル TRIM5 α はカニクイザル TRIM5 α が感染を阻害でき

ない株 HIV-2 GH123/Q の感染も阻害した。そこでアカゲザル TRIM5 α のどの領域がこの広範な HIV-2 阻害能を決定しているのかを、アカゲザルとカニクイザルのキメラ TRIM5 α を作製し、その HIV-2 感染阻害能を検討した。その結果、アカゲザル TRIM5 α の SPRY 領域の種間で配列や長さに多型が認められる variable region 1 (V1) 内にある 339 番目から 341 番目のアミノ酸 TFP をカニクイザル TRIM5 α の対応する 1 アミノ酸 Q と交換するだけでアカゲザル TRIM5 α はカニクイザル TRIM5 α と同様に広範な HIV-2 感染阻害能を失うことが明らかになった。一方、カニクイザル TRIM5 α の V1 内の前述の 1 アミノ酸 Q をアカゲザル TRIM5 α の対応する TFP と交換するだけでカニクイザル TRIM5 α は広範な HIV-2 感染阻害能を獲得した。以上の結果から、V1 が TRIM5 α と HIV-2 カプシドの結合に重要な領域であることが明らかとなった。

(2) V1 領域のみをヒヒ TRIM5 α の配列と入れ替えたカニクイザル TRIM5 α は、アカゲザル TRIM5 α と同様に広範な HIV-2 感染阻害能を示した。この結果は、ヒヒが HIV-2 に感染感受性を示すとの過去の報告と矛盾する。しかし、ヒヒの SPRY ドメイン全体をもつ TRIM5 α は HIV-2 感染阻害効果が減弱していた。SPRY ドメインに存在する他の variable region の HIV-2 感染阻害における寄与を調べた所、V2 領域の 385 番目のヒヒ特異的なプロリンからセリンへの 1 アミノ酸置換がヒヒ TRIM5 α の抗 HIV-2 活性を減弱させている事が明らかになった。

D. 考察

本研究により、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。ホモロジーモデリング法によって SPRY ドメインの 3 次元構造を予測したとこ

ろ、V2 領域の 385 番目のアミノ酸は SPRY ドメインの表面上に位置し、V1 領域の 339 番目から 341 番目のアミノ酸に近接していた。従って、V1 と V2 の両領域が作る構造がウイルスカプシドの認識に重要であると考えられた。一方、旧世界サルこれらの領域には種内の多型も認められるため、サル感染モデルを構築する上では、使用するサルの TRIM5 α の種内多型も考慮する必要があると考えられる。

E. 結論

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、TRIM5 α の 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。旧世界サルの TRIM5 α のこれらの領域には種内の多型も認められるため、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、使用するサルの TRIM5 α の種内多型も考慮する必要があると考えられる。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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 TRIM5 α SPRY (B30.2) domain on anti-human immunodeficiency virus type 2 activity. *Virology*.2009; 388(1):160-8.
- 2) 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*. 2009; 6:70.
- 3) Nakajima T, Nakayama EE, Kaur G, Terunuma H, Mimaya JI, Ohtani H, Mehra N, Shioda T, Kimura A. Impact of novel TRIM5 α variants, Gly110Arg and G176del, on the anti-HIV-1 activity and the susceptibility to HIV-1 infection. *AIDS*. 2009; 23(16):2091-100
 - 4) Likanonsakul S, Rattanatham T, Feangvad S, Uttayamakul S, Prasithsirikul W, Tunthanathip P, Nakayama EE, Shioda T. HLA-Cw*04 allele associated with nevirapine-induced rash in HIV-infected Thai patients. *AIDS Research and Therapy*. 2009;6(1):22
 - 5) Onyango CO, Leligdowicz A, Yokoyama M, Sato H, Song H, Nakayama EE, Shioda T, Silva T, Townend J, Jaye A, Whittle H, Rowland-Jones S, Cotton M. HIV-2 Capsids Distinguish High and Low Virus Load Patients in a West African Community Cohort. *Vaccine*. 2009. in press
 - 6) Nakayama EE, Shioda T. Anti-retroviral activity of TRIM5 (alpha). *Reviews in Medical Virology*. 2009. in press
 - 7) 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* 2010. in press
 - 8) Nuanjun Wichukchinda, Toshiaki Nakajima, Nongluk Saipradit, Emi E. Nakayama, Hitoshi Ohtani, Archawin Rojanawiwat, Panita Pathipvanich, Koya Ariyoshi, Pathom Sawanpanyalert, Tatsuo Shioda, and Akinori Kimura. TIM1 haplotype may control the disease progression to AIDS in a HIV-1-infected female cohort in Thailand. *AIDS*, In press.
- ## 2. 学会発表
- 1) 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 2009年9月14日 Il Ciocco Hotel and Resort (イタリア)
 - 2) 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学術集会 2009年10月25日 都市センターホテル (東京都)
 - 3) 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学術集会 2009年10月26日 都市センターホテル (東京都)
 - 4) 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 α -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 都市センターホテル (東京都)
 - 5) 宮本直、塩田達雄、中山英美 HIV-2 カプシドの1アミノ酸変異がもたらすウイルス増殖への影響 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月26日 都市センターホテル (東京都)
 - 6) 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 HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 第57回日本ウイルス学会学術集会 2009年10月27日 都市センターホテル (東京都)
 - 7) 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 HIV-1 ゲノム二量体化と粒子成熟ステップの相関 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 2009年11月26日 名古屋国際会議場 (愛知県)

- 8) 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 α -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・総会 2009年11月26日 名古屋国際会議場（愛知県）
- 9) 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 2009年11月28日 名古屋国際会議場（愛知県）
- 10) 宮本 直、塩田達雄、中山英美 HIV-2 カプシドの 1 アミノ酸変異がもたらすウイルス増殖への影響 第23回日本エイズ学会学術集会・総会 2009年11月28日 名古屋国際会議場（愛知県）

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

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

研究分担者 梁 明秀 横浜市立大学医学部微生物学 教授

研究要旨： HIV プロテアーゼは構造タンパク質である Gag および自身を含めた Pol 領域にコードする酵素群の切断および活性化を担うことで、ウイルスの複製や感染性の維持に重要な役割を果たす。一方、HIV プロテアーゼが切断する宿主因子やその意義を論じた報告は少なく、細胞内の主要なシグナル伝達機構に寄与する因子を基質とする報告は未だない。本研究では、コムギ無細胞タンパク質合成系による網羅的な宿主プロテインキナーゼライブラリーの作成とアルファスクリーンによる高感度、ハイスループット検出系を開発し、HIV-1 プロテアーゼにより切断される宿主プロテインキナーゼを同定し、ウイルス増殖や病態との関連について考察した。

A. 研究目的

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たハイスループット検出系を用いて解析を行う。特に、本研究課題においては、HIVプロテアーゼと宿主因子の相互作用を明らかにし、ウイルス増殖や病態との関連について考察を行う。

B. 研究方法

ヒト全長 cDNA ライブラリーMGC クローン由来の約 420 種類の完全長プロテインキナーゼ遺伝子をもつ大腸菌から PCR 法を用いて、鋳型 DNA の構築を行い、コムギ無細胞タンパク質合成系によりプロテインキナーゼタンパク質ライブラリーの構築を行った。また、ビオチン化に必要な配列を N 末端に付加したキナーゼ遺伝子を nested-PCR 法を用いて作製し、in vitro transcription 後、ビオチンリガーゼ BirA とビオチンを上記無細胞系に加えることにより、ビオチンでラベルしたプロテインキナーゼタンパク質を得た。また、各種 HIV-1 分子クローンより PCR 法を用いて、転写鋳型となる DNA 構築し、96 ウェルプレート内で転写-翻訳を行う。次に HIV プロテアーゼタンパク質をコムギ無細胞法にて合成し、Gag の切断活性を保持していることを確認する。HIV-1 プロテアーゼによる宿主因子の切断活性についてアルファスクリーンを用いた近接アッセイを用いて行った。

(倫理面への配慮)

国立感染症研究所研究等倫理規程を遵守し、倫理委員会の承認の下に研究を進める。特に、患者様個人情報の管理には万全を期し、ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針（文部科学省、厚生労働省、経済産業省、平成13年告示）に準じて連結可能匿名化を行い、本研究に関与しない個人情報管理者が個人情報を管理するようにする。また、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、病原体取扱規程等を遵守する。具体的には、横浜市立大学病原体安全管理規程及び病原体移動ガイドラインに従い、バイオセーフティ委員会の承認の下に実験を行う。

C. 研究結果

HIV-1プロテアーゼが切断する宿主因子の探索

コムギ無細胞タンパク質合成系を用いて、420種類の完全長プロテインキナーゼライブラリーの作成に成功した。また、上記の無細胞系とアルファスクリーン系を用いることにより、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タンパク質の同定を行った。その結果、宿主キナーゼであるTBK1がHIV-1プロテアーゼの基質であることが確認できた。また、293TおよびHeLa細胞にTBK1とHIV-1プロテアーゼを共発現させた場合にもTBK1の切断が認められ、これは各種プロテアーゼ阻害剤の添加により阻害された。

HIV-1プロテアーゼによる切断部位のマッピング

ペプチドのアミノ酸シーケンス法によりHIV-1プロテアーゼによる切断部位の同定を行った。その結果、TBK1のL683/V684の間を切断することが示唆された。次にL683およびV684をそれぞれAlaに置換した変異体を作製したところ、HIV-1プロテアーゼによる切断から回避された。

HIV-1Gag-Polに産物によるI型インターフェロンプロモータ活性の亢進

次にHIV-1プロテアーゼによるTBK1の活性化について、TBK1の基質であるIRF3のリン酸化のイムノブロットおよびIFN β プロモータの活性をジーンレポーターアッセイを用いて解析した。その結果、HIV-1Gag-PolはIRF3のリン酸化とIFN β のプロモータ活性を顕著に増加させた。興味深いことに、プロテアーゼ存在下においてTBK1の活性の亢進が認められた。これらにより、HIV-1Gag-PolはTBK1と結合することでTBK1の活性化を促進し、IRF3のリン酸化とIFN β の産生を促進することが示唆された。

D. 考察

本研究は、HIVプロテアーゼが基質とする宿主プロテインキナーゼタンパク質の網羅的探索技術の開発を目指している。網羅的なプロテインキナーゼの切断解析には、1) プロテインキナーゼライブラリーの整備、2) 未精製タンパク質を用いた高感度な検出系、という2つのコア技術の開発が必要である。本年度の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組み合わせることで、これらコア技術の開発に成功し、新規にTBK1をHIV-1プロテアーゼの基質として同定した。

HIV-1プロテアーゼの宿主因子に対する切断とその意義については、過去にわずかに報告があるのみである。それらは細胞骨格系因子(アクチン)、細胞膜タンパク質(APP)、カスパーゼ等である。しかしながら、本研究における自然免疫シグナルの中心的な役割を果たすキナーゼが同定されたことは大変意義が有り、興味深い。このような事例として、HCVのプロテアーゼがIPS-1というシグナル伝達因子を切断することで、HCV感染による自然免疫応答を阻止することが知られている。

HIV-1プロテアーゼの特性として、プロテアーゼ阻害剤投与に伴う種々の薬剤耐性変異があげられる。一般に薬剤耐性変異は活性中心周辺に見られ、酵素活性自体に影響を及ぼす。本研究で明らかとなったTBK1の切断効率も、種々の薬剤耐性変異を有するプロテアーゼ毎に異なることから、個々の患

者の薬剤耐性プロフィールにより、HIV-1プロテアーゼによるI型インターフェロン産生量が異なることが予想される。今後はこれらの臨床的事項との関連やエイズ発症との関連についてさらに検討する必要がある。

E. 結論

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を同定した。今後はウイルス複製や病原性への発現への影響についてさらに詳細に解析を行う予定である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.* 2009 Dec;5(12):e1000700.
- 2) Matsuura I, Chiang KN, Lai CY, He D, Wang G, Ramkumar R, Uchida T, Ryo A, Lu K, Liu F: Pin1 promotes transforming growth factor-beta-induced migration and invasion. *J Biol Chem.* 2010 Jan 15;285(3):1754-64.
- 3) Zhou W, Yang Q, Low CB, Karthik BC, Wang Y, Ryo A, Yao SQ, Yang D, Liou YC: Pin1 catalyzes conformational changes of Thr-187 in p27Kip1 and mediates its stability through a polyubiquitination process. *J Biol Chem.* 2009 Sep 4;284(36):23980-8.
- 4) 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.* 2009 Jul 1;183(1):524-32.
- 5) Jeong SJ, Ryo A, Yamamoto N: The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Apr 3;381(2):294-9.
- 6) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki

- I, Morikawa Y, Yamamoto N: Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. FEBS Lett. 2009 Apr 17;583(8):1243-50. Epub 2009 Mar 25.
- 7) Ryo A, Wulf G, Lee TH, Lu KP: Pinning down HER2-ER crosstalk in SMRT regulation. Trends Biochem Sci. 2009 Apr;34(4):162-5.
2. 学会発表
- 1) 梁明秀、山本直樹：HIV-1産生を制御するtetherin相互作用蛋白の同定. 特定領域研究「感染現象のマトリックス」縦糸研究会, 平成21年5月20～21日, 名古屋大学, 名古屋.
- 2) 梁明秀：HIV-1 Gag タンパク質の細胞内ダイナミクス関連因子の同定とその制御機構の解明. 第9回日本蛋白質科学会年会, 平成21年5月20～22日, 熊本全日空ニュースカイ, 熊本.
- 3) 宮川 敬, 梁明秀, 山本直樹：宿主蛋白質 BCA2/Rabring7 は tetherin と協調して HIV-1 粒子産生を抑制する. 第19回抗ウイルス療法研究会, 平成21年6月4～5日, ゆうぽうと, 東京.
- 4) 梁明秀：The peptidyl-prolyl isomerase Pin1: A novel post-phosphorylation modifier indevelopment and diseases. 先端融合領域イノベーション創出拠点の形成翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成 第1回公開シンポジウム「分析技術の発達により見えてきた蛋白質の翻訳後修飾とその異常」, 平成21年6月19日, 港南区民文化センター ひまわりの郷, 横浜.
- 5) 梁明秀：ペプチジルプロリルイソメラーゼ Pin1:疾患や分化を司る新しいリン酸化後修飾因子. 日本ヒトプロテオーム機構(JHUP)第7回大会, 平成21年7月27～28日, 北里大学薬学部, 東京.
- 6) Miyakawa K, Ryo A, Yamamoto N: Identification of a tetherin-interacting protein that restricts HIV-1 particle production. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. Sep. 8-11, 2009, Hyogo.
- 7) 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, 平成21年9月28～29日, ホテル日航熊本, 熊本.
- 8) 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.
- 9) 熱田翠薫, 吉田篤司, 吉崎慎二, 八島さやか, 松永智子, 澤崎達也, 梁明秀：免疫抑制受容体 PD-1 を阻害する新規抗体の作製. 第32回分子生物学会年会, 平成21年12月9～12日, パシフィコ横浜, 横浜.
- 10) 小島良績, 後藤さやか, 近藤麻美, 木下茂美, 梁明秀：滑膜細胞における C/EBP- β に対する Pin1 の効果. 第32回分子生物学会年会, 平成21年12月9～12日, パシフィコ横浜, 横浜.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
発明の名称：「A Method for Screening anti-HIV Drugs and a Diagnostic Method of AIDS」、米国特許：12/188,242、発明者：梁明秀、澤崎達也、山本直樹、2008年8月8日、出願人：厚生労働省、株式会社セルフリーサイエンス
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

宿主因子による HIV 抑制法の開発研究

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 小林 朋子 大学院生

研究要旨：宿主因子による HIV 感染抑制法の開発研究として、ウイルス前期過程を抑制する宿主因子の単離に焦点を絞った。ヒト白血球 cDNA ライブラリ導入 MT-4 細胞から HIV-1 感染前期過程が抑制されている細胞のスクリーニング実験を行い、その細胞からウイルス抑制遺伝子を単離した。それは、本来は mRNA のプロセッシングに関わる分子である Cleavage and polyadenylation specific factor 6 (CPSF6) の欠損変異体遺伝子であった。新たに CPSF6 欠損遺伝子を別の細胞に導入すると HIV 感染前期課程が特異的に抑制させることができた。今回の実験系は、レンチウイルスベクターによるスクリーニング実験であるので、そのまま遺伝子治療ベクターとして利用が可能である利点がある。

A. 研究目的

HIV の持続感染は CD4 陽性細胞の著減による免疫不全症であるエイズの発症を誘導し、ヒトを死に陥れる。Highly active antiretrovirus therapy (HAART) の導入により、エイズ発症者ならびに死亡者は格段に減少した。しかし、本療法は服薬の持続が必須であり、薬剤による副作用ならびに合併症などの臨床的問題、そして、感染者への生涯にわたる服薬負荷などの社会的問題が大きな課題である。さらに、HIV は、HAART によってもリンパ組織において持続感染するために、エイズに対する根治は不可能である。そして、制御不能なウイルスの増殖と潜伏感染 reservoir の存在はエイズ病態形成の主たる要因である。本研究では、宿主因子を利用したウイルス増殖制御による新たな感染拡大阻止法を開発することに力点を置いた。これまでに我々の研究グループは、cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入細胞スクリーニング系を確立し、HIV 抑制宿主遺伝子の単離に成功してきた (Kawano et al. J. Virol. 78: 11352-11359, 2004, Yoshida T, et al. Traffic 9: 540-558, 2008)。そこで、この抗 HIV スクリーニング系の改変により、前期過程に焦点を絞った新たな HIV 感染阻止法の開発研究をすすめた。

B. 研究方法（倫理面への配慮）

1) cDNA ライブラリ発現レンチウイルスベクターによる抗 HIV 遺伝子の単離実験

renilla green fluorescent protein(hrGFP)発現レンチウイルスベクターにより、ヒト白血球の cDNA ライブラリ (Invitrogen, Carlsbad, CA) を恒常的に発現させた T 細胞株 (MT-4) を既報のように作製した (図 1. ステップ 1) (Kawano et al. J. Virol. 78: 11352-11359, 2004)。VSV シュードタイプ cyan fluorescence protein (CFP) 発現レンチウイルスベクターを感染させ (図 1. ステップ 2)、非感染細胞 (CFP 陰性細胞) をセルソーターにより分取した (図 1. ステップ 3)。この CFP 発現レンチウイルスベクター暴露後に非感染細胞をソートする実験を繰り返し、その導入 cDNA を PCR 法により単離した。

2) 細胞培養

ヒト胎児腎臓由来の 293T 細胞は、10%ウシ胎仔血清 (FCS) 含 D-MEM にて、CD4 陽性ヒト T 細胞である MT-4 細胞は 10%FCS 含 RPMI1640 にて培養を行った。

3) HIV 感染実験

HIV-1_{NL4-3} を産出する感染性プラスミド DNA を 293T 細胞に transfection し、あるいは、HIV-1 の *nef* 領域に luciferase 遺伝子ならびに *env* 領域に欠損を導入した NL-luc プラスミドと Env 蛋白発現プラスミドを 293T 細胞に cotransfection した (シングルラウンド感染実験) それぞれの細胞の培養上清をウイルス液として用いた。作出したウイルス量の定量のために、HIV-1p24^{ELISA} enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キット (ZeptoMetrix) を用いた。HIV-1_{NL4-3} の感染性の

測定には tissue culture infective dose (TCID₅₀) を算出した。MT-4 細胞への感染実験には、HIV-1_{NL4-3} の場合は moi0.001、NL-luc の場合は p24^{gag} 量として 200ng を用いた。

4) flow cytometry 解析

hrGFP ならびに CFP 発現率を FACS Canto により測定した。Cy5 標識 HIV-1 p24^{gag} 特異的単クローン抗体 (2C2; 琉球大学田中勇悦博士より分与) を用いてその陽性率を測定した。

5) 統計処理

2 群の比較にはウェルチの t 検定を行なった。P 値が 0.005 以下のものは統計学的に有意な差があるものとした。

(倫理面への配慮)

本研究においてはすべて樹立培養細胞を用いており、その使用にあたり細胞樹立者により倫理的配慮はなされている。実験動物は使用していない。臨床検体等のヒト細胞ならびにゲノム解析は行っていない。

C. 研究結果

1) CFP 発現レンチウイルスベクターに対して抵抗性獲得細胞からの CPSF6 の欠損変異体遺伝子の単離

VSV シュードタイプ CFP 発現レンチウイルスベクターを感染後、細胞ソートにより hrGFP 陽性そして CFP 陰性である HIV-1 感染抵抗性を示す細胞を分取した (図 2A)。そして、この感染と細胞ソート操作を 7 回繰り返し、明らかに HIV-1 感染抵抗性を示す細胞をクローン化した。その細胞に組み込まれている cDNA を PCR 法により増幅し、遺伝子配列を決定したところ、それは、Cleavage and polyadenylation specific factor 6 (CPSF6) の欠損変異体であることがわかった。それは、CPSF6 の cDNA コード領域の 179~360 アミノ酸領域であった (図 2B)。

2) CPSF6 の抗 HIV 活性

シングルラウンドの HIV-1 感染実験において、この CPSF6 変異体の抗 HIV 活性を測定するために、新たに CPSF6 欠損変異体あるいは control vector を導入した MT-4 細胞に、ルシフェラーゼ発現 HIV-1 (NL-luc) を感染させた。その結果、CPSF6 欠損変異体細胞では NL-luc 感染後 2 日目のルシフェラーゼ活性は control vector のそれに比べ約 100 分の 1 に抑制されていた (図 3A)。また、CPSF6 欠損変異体導入細胞では、VSV-G シュードタイプ MLV ベクター (SR α -CFP) の感染も抑制されたが NL-luc に対する抑制率より明らかに低かった (結果示さず)。次に、HIV-1_{NL4-3} を感染させ、その複製率を上清中に検出される 24^{gag} 量を ELISA によって評価した。その結果、CPSF6 欠損変異体細胞では HIV-1_{NL4-3} の複製が明らかに抑制されていた (図 3B)。一方、感染後 2 日目の細胞内における p24^{gag} をフローサイトメーターによって解析した結果、CPSF6 欠損変異体細胞では p24^{gag} の発

現はほとんど確認されなかった (図 3C)。

D. 考察

CPSF6 欠損変異体の抗 HIV 活性が、本当に前期課程にのみ働いているかを確認するためには、この遺伝子導入細胞へのルシフェラーゼ発現プラスミド DNA、あるいは、HIV-1_{NL4-3} を産出する感染性プラスミド DNA を transfection し、その抑制は見られないことを確認する必要がある。今後、それを予定している。

今回用いた HIV-1Env 蛋白を介するウイルス感染 (NL-luc) と VSVG 蛋白を介するウイルス感染 (CFP 発現レンチウイルスベクター) では、脱殻から組み込み過程において共通の機序により感染を成立させるので、CPSF6 欠損変異体は侵入以降の感染前期過程を抑制している可能性がきわめて高い。今後は、見出された HIV 感染抑制因子の抑制機構の解析とその応用を推進する。

今回の実験系は、レンチウイルスベクターによるスクリーニング実験であるので、そのまま遺伝子治療ベクターとして利用が可能である利点がある。そして、遺伝子治療ベクターの動物モデルにおける検証が次に必要である。そこで、我々が開発したヒト血液幹細胞移植マウス (Nie C, et al. *Virology* 394:64-72, 2009) に遺伝子導入実験を行い、生体におけるウイルス抑制性を今後、検討する。CPSF6 の抗 HIV 活性は米国の学会での報告はあるが、論文化はされていない。そして、遺伝子治療ベクターへの応用はユニークである。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sato K, Yamamoto SP, Misawa N, Yoshida T, Miyazawa T, Koyanagi Y. Comparative study on the effect of human BST-2/Tetherin on HIV-1 release in cells of various species. *Retrovirology*, 6: 53, 2009.
- 2) 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, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J and Uchiyama T. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology* 9, 1, 2009.
- 3) 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

- 4) 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.
- 5) Nie C, Sato K, Misawa N, Kitayama H, Fujino H, Hiramatsu H, Heike T, Nakahata T, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. HIV-1 productive infection in CD4⁺ effector memory T lymphocytes and CD4⁺ T lymphocyte depletion in humanized NOD/SCID/IL2R γ null mice. *Virology* 394:64-72, 2009.
- 6) Inaba K, Fukazawa Y, Matsuda K, Himeno A, Matsuyama M, Ibuki K, Miura Y, Koyanagi Y, Nakajima A, Blumberg RS, Takahashi H, Hayami M, Igarashi T, Miura T. Small intestine CD4⁺ cell reduction and enteropathy in SHIV-KS661-infected rhesus macaques in presence of low viral load. *J Gen Virol*. 91, 773-781, 2010.
- 7) Sato K, Nie C, Misawa N, Tanaka Y, Ito M, Koyanagi Y. Dynamics of memory and naive CD8⁺ T lymphocytes in humanized NOD/SCID/IL-2R γ null mice infected with CCR5-tropic HIV-1. *Vaccine*, in press.
2. 学会発表
- 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, D-179, Montreal, 2009.
- 2) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顯, 小柳義夫. Small GTPase Rac2によるHIV-1増殖制御. 第7回感染症沖縄フォーラム, 沖縄, 2009.
- 3) 渡部匡史, 鈴木陽一, 宮澤正顯, 小柳義夫. Small GTPase Rac2によるHIV-1増殖制御. 第7回感染症沖縄フォーラム, 沖縄, 2009.
- 4) 小柳義夫, 佐藤佳, 伊藤守. シンポジウム「ヒト血液幹細胞移植マウスのウイルス病原性解析への利用」第56回日本実験動物学会, 大宮, 2009.
- 5) 小柳義夫, HIV-1放出抑制分子BST-2の解明 第50回日本熱帯医学会大会シンポジウム, 沖縄, 2009.
- 6) 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.
- 7) 佐藤佳, 三沢尚子, Chuanyi Nie, 高橋玲, 伊藤守, 葛島清隆, 高田賢藏, 小柳義夫. 致死性EBV感染症モデルマウスの作製と病態解析. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 3WSA5, 東京, 2009.
- 8) 山元誠司, 大川克也, 増田貴夫, 森川裕子, 小柳義夫, 鈴木陽一. レトロウイルスインテグラーゼ結合性因子Huwe1の同定とHIV-1感染における役割. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 9) 小林朋子, 芳田剛, 佐藤佳, Peter Gee, 蝦名博貴, 小柳義夫. Bst-2とHIV-1Vpu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.
- 10) 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.
- 11) 鈴木康嗣, 小川加那子, 小柳義夫, 鈴木陽一. レトロウイルスゲノムの組み込み機能を阻害する細胞性キナーゼの同定とその作用機序の解析. 第57回ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 12) 蝦名博貴, 小柳義夫. DNA損傷部位へのインテグラーゼ非依存レトロウイルスDNAの遺伝子組み込み機構. 第57回日本ウイルス学会学術集会, 東京, 2009.
- 13) 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, 062-335, 名古屋, 2009.
- 14) 山元誠司, 大川克也, 増田貴夫, 森川裕子, 小柳義夫, 鈴木陽一, HIV-1インテグラーゼ相互作用因子Huwe1によるHIV-1の感染抑制. 第23回日本エイズ学会学術集会, 名古屋, 2009.
- 15) 小柳義夫, 佐藤佳. テトラスパニンによるレトロウイルス感染制御. 第32回日本分子生物学会年会, 4W9-3, 横浜, 2009.
- 16) Sato K, Misawa N, Nie C, Takahashi R, Ito M, Kuzushima K, Takada K, and Koyanagi Y. Epstein-Barr virus is productively replicated in humanized NOD/SCID/IL2g^{null} mice simulating severe complications observed in patients with fatal EBV infection, 第39回日本免疫学会総会・学術集会, 3-K-W63-7-0/P, 大阪, 2009.
- H. 知的所有権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

図1 レンチウイルスベクターを用いた前期過程抑制遺伝子の単離法

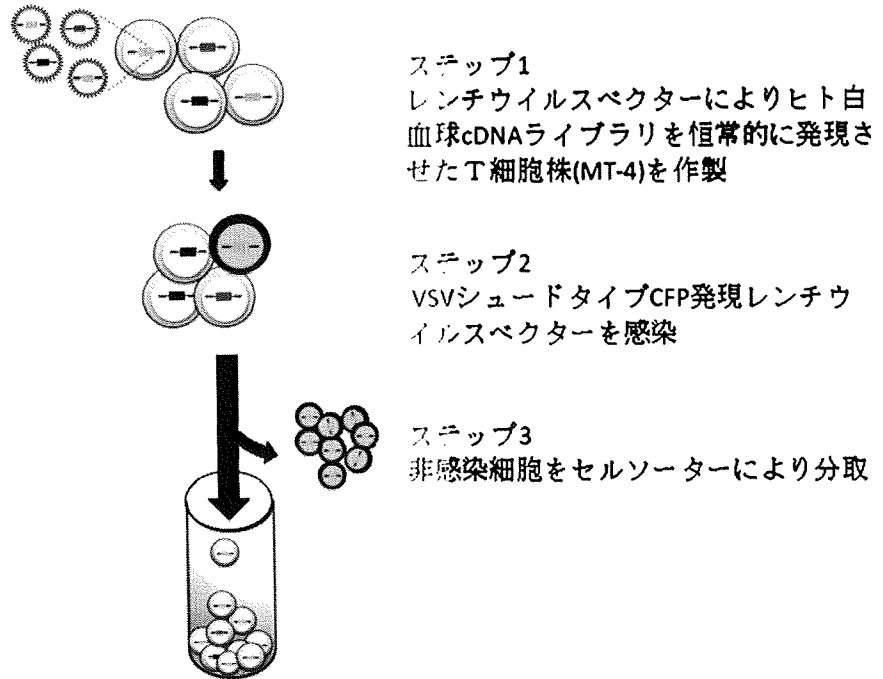
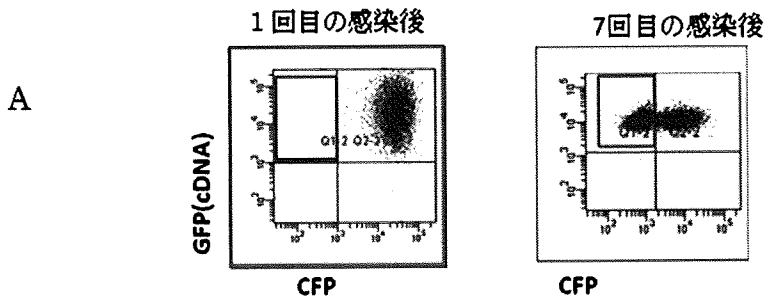


図2. CPSF6 の欠損変異体遺伝子の単離



CFP陰性細胞よりCPSF6)の欠損変異体が単離された。

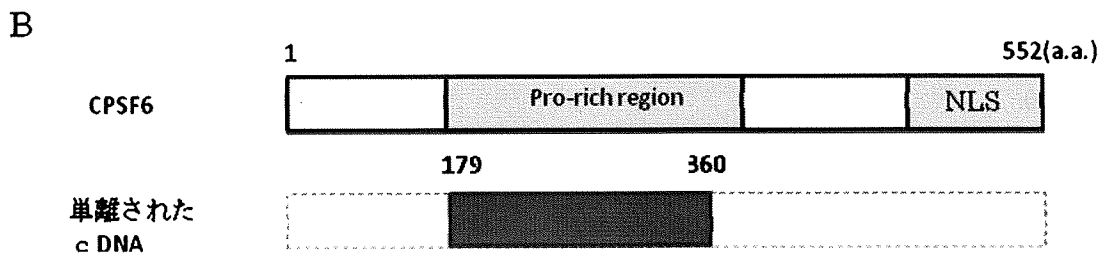
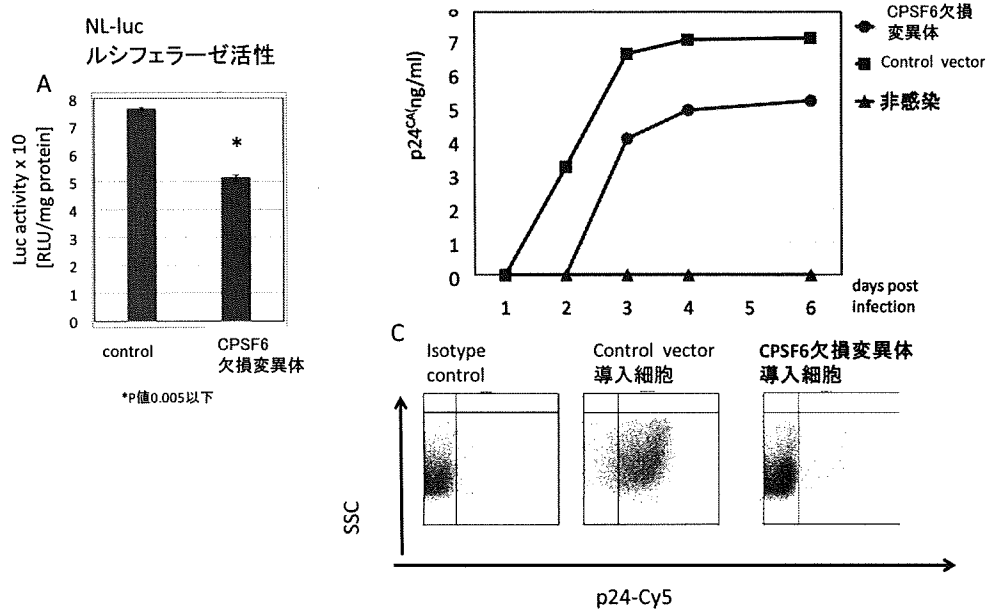


図3. CPSF6 の抗HIV活性



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

研究分担者 宮澤 正顯 近畿大学医学部 教授

研究要旨: 特定の HIV-1 感染者と継続的に非防御的な性的接触を繰り返しているが、HIV-1 ゲノムも血清抗 HIV-1 IgG 抗体も検出されない HIV-1 曝露非感染者は、その末梢血 T リンパ球が HIV 抗原に反応して強い IFN- γ 産生を示し、HIV-1 感染に対する免疫学的抵抗性を自然に獲得した例と考えられる。我々は、レトロウイルス中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* をマウス第15染色体上にマッピングし、これと相同なヒト遺伝子が HIV-1 曝露非感染者における抵抗性要因となっている可能性を追求してきた。今年度は、1) イタリアコホート、タイ・ランパンコホートともに、曝露非感染者群では *Rac2* 遺伝子第5イントロンに特定のハプロタイプが有意に集積していること、2) 両コホートで曝露非感染者に集積するイントロンハプロタイプは、何れも遺伝子発現の増強作用があること、3) *Rac2* 第5イントロンの遺伝子発現調節領域は、約 800bp の範囲に絞り込み、rs2284037 (T/C) と rs4140870 (A/G) の塩基置換が機能上特に重要であること、4) *Rac2* イントロンに高発現型のハプロタイプを持つ細胞では CCR5 指向性 HIV-1 の複製が強く抑制されるが、siRNA を用いて *Rac2* の発現を抑制すると、複製阻害が見られなくなることを明らかにした。さらに、上記 siRNA 発現細胞を用いて下流エフェクター機構を解析した結果、5) *Rac2* 高発現細胞では CCR5 発現の低下と CCR5 リガンドである CCL5 の発現・産生増強が起こり、これらの結果 CCR5 指向性 HIV-1 の標的細胞侵入を抑制している可能性があることが明らかとなった。

A. 研究目的

有効なウイルス感染防御法および治療法を開発するには、自然に感染抵抗性を示す個体群の遺伝的要因を明らかにするのが早道である。HIV-1 感染の成立後に初期のウイルス複製を制御する因子として宿主 MHC 遺伝子多型の重要性が明らかにされる一方で、HIV-1 感染の成立に対し抵抗性を付与すると考えられる宿主遺伝子として、HIV の細胞側受容体であるケモカインレセプターおよびそのリガンドの多型や、マクロファージ・抗原提示細胞系の機能に関与するマンノース結合レクチン、DC-SIGN などの遺伝子多型が報告されてきた。しかし、ケモカインレセプター発現欠損の頻度は低く、イタリア・タイ・アフリカで把握されてきた HIV-1 曝露非感染者 (HIV-1-exposed seronegative individuals: ESN) の多くは、CCR5 発現欠損ではその感染抵抗性を説明できない。

我々はマウスレトロウイルス感染時に中和抗体の産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* を第15染色体上にマップし、そのオーソログが存在すると考えられるヒト第22染色体上に、ESN の原因遺伝子が存在する可能性を指摘してきた (Kanari, Y.,

et al. AIDS 19:1015-1024, 2005)。

本研究では、曝露非感染者が持つと考えられる抵抗性宿主遺伝子の機能を HIV-1 感染防御および AIDS 発症予防に結びつけることを目指し、抵抗性遺伝子の分子実体を明らかにするとともに、その作用機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1) HIV-1 曝露非感染者の第22染色体遺伝子多型解析

これまでの研究により、HIV-1 曝露非感染者では第22染色体の *D22S277*、*D22S272*、及び *D22S423* と連鎖する領域に抵抗性遺伝子が存在すること、候補領域の遺伝子のうち *Rac2* のみが、末梢血単核球の HIV-1 抗原刺激により有意な発現上昇を示すことが明らかとなっていた。そこで、イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者とその感染パートナーに加え、タイ・ランパンコホートの曝露非感染者と HIV-1 感染者群について、*Rac2* 遺伝子領域のゲノム塩基配列を決定し、多型の存在を調べるとともに、群間で頻度差のあるハプロタイプ