

減圧留去。

・濃縮物をシカゲルクロマトグラフで精製することにより、黄橙色油状物として化合物 3 を得た。

b. 第二工程

・化合物 3 のクロロホルム溶液に 0°C でトリエチルアミン、4-ジエチルアミノピリジン、塩化ピバロイルを順に加え、室温に戻しながら 16 時間攪拌。

・反応液に水を加えた後、酢酸エチルで抽出。更に酢酸エチルで再抽出。

・有機層に 20% 塩化アンモニウム水、20% 重曹水、20% 食塩水を加えて洗浄。

・有機層に無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去。

・濃縮物をシカゲルクロマトグラフで精製することにより、黄色油状物として化合物 4 を得た。

第三工程

・化合物 4 のメタノール溶液に窒素気流下、グアニジン溶液を滴下し、室温で 3 時間 30 分攪拌。

・反応液に酢酸エチルを加えた後、20% 塩化アンモニウム水、20% 食塩水を順に加えて洗浄。

・有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去。

・濃縮物をシカゲルクロマトグラフで精製することにより、微黄色油状物として化合物 5 を得た。

第四工程

・化合物 5 をジクロロメタンに溶解。

・窒素気流下 0°C で四臭化炭素、トリフェニルホスフィンを加えた後、同温で 1 時間 30 分攪拌。

・反応液の溶媒を減圧留去した後、濃縮物をシカゲルクロマトグラフで精製することにより、黄色油状物として化合物 6 を得た。

・化合物 7 に水酸化カリウムのメタノール溶液を加えた後、0°C に冷却した。

・反応液に塩化カルシウム二水和物及び化合物 6 のメタノール溶液を加えた後、-5°C で 18 時間 30 分攪拌。

・反応液の溶媒を減圧留去した後、1M 塩酸水溶液を加えて酢酸エチルで抽出。

・有機層に 20% 食塩水を加えて洗浄。

・有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去。

・濃縮物をシカゲルクロマトグラフで精製。

・得られた濃縮物をヘキサンで再結晶することにより、黄白色粉末として 234-12-0Piv を得た。

D. 考察

最終年度は、大きな研究方向性の変換をもった。赤痢アメーバ創薬研究においては、2 年度まで、赤痢アメーバ MGL を標的としたプロドラッグ・トリフルオロメチオニン (TFM) 誘導体の最適化と安全性試験の結果を常に考慮しながら研究を展開してきた。しかし、2 年度の結果により、TFM 誘導体に安全性に係る若干の問題が見いだされ、開発パイプラインの見直しを余儀なくされた。そこで最終年度は、創薬標的である含硫アミノ酸代謝経路の生理的意義をより深く理解し、今一度、本経路における別の酵素を標的とすることを視

野に、今後の創薬の基盤を作ることを目指した。CE-ToFMS を用いたメタボローム解析手法を用いて、システイン飢餓 (=酸化ストレス) が含硫アミノ酸などの代謝にどのような影響を示すかを網羅的に解析した。その結果、これまで全く知られていなかった代謝物、代謝経路が発見されるとともに、システイン飢餓が中心代謝に重篤な変化と傷害を与えることが示された。したがって、含硫アミノ酸代謝の創薬標的としての正当性は一段とバリデートされたと言える。

また、継続的に行われた赤痢アメーバ MGL の X 線構造解析によって MGL の基質特異性に水素結合ネットワークとこのネットワークを形成するアミノ酸残基の状態が深く関わっていることが示された。また MGL2 の固有の基質特異性の要因に、MGL2 活性部位の Glu116 の存在が関係していることが初めて明らかにされた。MGL/メチオニンの反応中間体が複数得られ、この成果によって世界で初めてこれまで不明であった反応機構の詳細が明らかにされた。言うまでもなく反応機構の物理化学的な理解は新しい薬剤のデザインに極めて重要であり、今後の TFM 誘導体の作成に生かされることが期待される。

C. parvum AOX は不安定な膜タンパク質であり、反応速度論的解析は進んでいなかったが、本研究により初めて CpAOX の反応速度論が議論できるようになった成果は大きい。CpAOX は界面活性剤非存在下においてミカエリスメンテン式に従い膜やキノンとの相互作用の様式が多種の AOX と異なると考えられた。また、C. parvum AOX の N 末端部位欠失変異体を用いた解析により、N 末端部 47 アミノ酸までは酵素活性への寄与は少ない一方で、48 アミノ酸以降の領域は活性に必要な鉄結合モチーフや構造の維持に必要な α ヘリックスの領域外であっても活性に影響を及ぼすと考えられた。MitoProtII により推定と抗体を用いた解析から、マイトソーム移行シグナルは 34 アミノ酸と推定された。CpAOX に有効な 234-12-0piv の合成も今後の安全性試験等に有効に活用されると期待される。

E. 結論

本研究は HIV 感染に付随する日和見原虫感染症に対する我が国発の抗原虫薬剤の創成を目指してきた。クリプトスポリジウム症の化学療法の標的である AOX の反応速度論的解析を終了するとともに、マイトソーム移行シグナルと活性部位を同定した。クリプトスポリジウム AOX の阻害剤の大量合成に成功した。赤痢アメーバの網羅的代謝物の解析により、代謝物レベルでの代謝全体像の俯瞰が可能となり、含硫アミノ酸代謝の創薬標的としての正当性が証明された。赤痢アメーバ創薬標的 MGL の反応機構における水素ネットワークの役割が解明された。以上、今後のクリプトスポリジウム症、赤痢アメーバ症創薬の発展に貢献した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Metabolome analysis revealed increase in S-methylcysteine and phosphatidylisopropanolamine synthesis upon L-cysteine deprivation in the anaerobic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 285, 39160-39170.
- 佐藤暖、野崎智義 (2010) 赤痢アメーバ原虫に対するトリフルオロメチオニン誘導体の有効性 ビタミン 84, 250-254.
- Jeelani, G., Husain, A., Sato, D., Ali, V., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. (2010) Two Atypical L-cysteine-regulated NADPH-dependent oxidoreductases involved in redox maintenance, L-cystine reduction, and metronidazole activation in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.*, 285, 26889-26899.
- Yousuf, M. A., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2010) Localization and targeting of unusual pyridine nucleotide transhydrogenase in *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* 9, 926-933.
- Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., Husain, A., and Nozaki, T. (2010) Conservation and function of Rab small GTPases in *Entamoeba*: annotation of *E. invadens* Rab and its use for the understanding of *Entamoeba* biology. *Exp. Parasitol.* 126, 337-347. (Review)
- Mendoza-Macías, C. L., Barrios-Ceballos, M. P., Anaya-Velázquez, F., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., and Padilla-Vaca, F. (2010) *Entamoeba histolytica*: molecular cloning and characterization of a novel neutral sphingomyelinase. *Exp. Parasitol.* 125, 279-285.
- Mishra, V., Ali, V., Nozaki, T., and Bhakuni, V. (2010) *Entamoeba histolytica* phosphoserine aminotransferase (EhPSAT): Insights into the structure-function relationship. *BMC Research Notes* 3, 52. doi:10.1186/1756-0500-3-52.
- Saito-Nakano, Y., Nakahara, T., Nakano, K., Nozaki, T., and Numata, O. (2010) Marked amplification and diversification of Rab GTPases in ciliates *Tetrahymena thermophila* and *Paramecium tetraurelia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 57, 389-399.
- Mukherjee, A. K., Das, K., Bhattacharya, M. K., Nozaki, T. and Ganguly, S. Trend of *Entamoeba histolytica* infestation in Kolkata. *Gut Pathogens* 2010, 2:12doi:10.1186/1757-4749-2-12.
- Masuda, I., Matsuzaki, M. and Kita, K. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of cyanide-insensitive alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. Kido, Y., Shiba, T., Inaoka, D. K. Sakamoto, K., Nara, K., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. *Acta Crystallographica* (2010) F66, 275-278.
- Hikosaka, K., Watanabe, Y., Tsuji, N., Kita, K., Kishine, H., Arisue, N., Palacpac, N. M. Q., Kawazu, S., Sawai, H., Horii, T., Igarashi, I. and Tanabe, K. Divergence of mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Mol. Biol. Evolution* (2010) 27, 1107-1116.
- Balogun, O. E., Inaoka, D. K., Kido, Y., Shiba, T., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. AM, Harada, S. and Kita, K. Overproduction, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase. *Acta Crystallographica* (2010) F66, 304-308.
- Kido, Y., Sakamoto, K., Nakamura, K., Harada, M., Suzuki, T., Yabu, Y., Saimoto, H., Yamakura, F., Ohmori, D., Moore, A., Harada, S. and Kita, K. Purification and kinetic characterization of recombinant alternative oxidase from *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)* (2010) 1797, 443-450.
- Masuda I, Matsuzaki M, Kita K. Extensive frameshift at all AGG and CCC codons in the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 gene of *Perkinsus marinus* (Alveolata; Dinoflagellata). *Nucleic Acids Research.* (2010) 38, 6186-6194.
- Nakamura, K., Fujioka, S., Fukumoto, S., Inoue, N., Sakamoto, Hirata, H., Kido, Y., Yabu, Y., Suzuki, T., Watanabe, Y., Saimoto, H., Akiyama, H. and Kita, K. Trypanosome alternative oxidase, a potential therapeutic target for sleeping sickness, is conserved among *Trypanosoma brucei* subspecies. *Parasitol. Int.* (2010) 59, 560-564.
- Hikosaka, K., Nakai, Y., Watanabe, Y., Tachibana, S., Arisue, N., Palacpac, N. M., Toyama, T., Honma, H., Horii, T., Kita, K. and Tanabe, K. Concatenated mitochondrial DNA of the coccidian parasite *Eimeria tenella*. *Mitochondrion*, (2010) 11, 273-278.

2. 学会発表

- Sato, D., Husain, A., Jeelani, G., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolic analysis of the human enteric parasite *Entamoeba histolytica*: Discovery of unique pathways and potential targets for chemotherapeutics. *Metabolomics* 2010, June 27-July 1, 2010, Amsterdam, The Netherlands
- Jeelani, G., Sato, D., Husain, A., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomics of parasite differentiation: metabolomic profiling of the human enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* revealed activation of unpredicted pathways during differentiation of the proliferative into dormant stage. *Metabolomics* 2010, June 27-July 1, 2010, Amsterdam, The Netherlands
- 村野祥子、佐藤暖、唐木剛、岡知宏、亀井加恵子、中沢隆、野崎智義、原田繁春 一連の酵素反応中間体との複合体構造に基づいた *Entamoeba histolytica* メチオニンガンマリアーゼ1の酵素反応機構第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 神戸、December 7-10, 2010
- Nozaki, T., Husain, A., Jeelani, G., Sato, D., Suematsu, M., and Soga, T. Metabolomic analysis of *Entamoeba*: discovery of unique pathways and potential targets for chemotherapy. *Amebiasis Workshop 2010, "Molecular Approaches and Clinical Aspects"* September 22-24, 2010, Montreal.
- Jeelani, G., Sato, D., Husain, A., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomic analysis during differentiation of enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* into the infectious cyst stage. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Mi-ichi, F., Ali, V., Suematsu, M., Soga, T., and Nozaki, T. Metabolomic analysis of sulfur containing amino acid metabolism in *E. histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- 古川敦、津久井久美子、山田陽子、坪井久美子、野崎智義 赤痢アメーバにおける病原性因子輸送機構の分子論的解明：新規システインプロテアーゼレセプターの同定と機能解析 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20-21, 2010.
- 見市文香、牧内貴志、モハンマド・アブ・ユースフ、野崎智義 赤痢アメーバ原虫 "mitosome" に存在する硫酸活性化経路の生理機能の解明 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20-21, 2010.
- 牧内貴志、見市文香、津久井久美子、野崎智義 *Entamoeba* マイトソームにおけるタンパク質輸送機構の解析 第79回日本寄生虫学会大会 旭川 May 20-21, 2010.
- Nozaki, T. Unprecedented role of the mitosome in *Entamoeba histolytica*. The 18th Meeting of the International Society for Evolutionary Protistology, July 2-7, 2010, Kanazawa, Japan
- Nozaki, T. Mitosomes from the enteric protozoan parasite *Entamoeba histolytica* possess unique functions and minimal import machinery. The XIIth International Congress of Parasitology. August 15-20, 2010, Melbourne, Australia.
- Saito-Nakano, Y., Okada, M., Penuliar, G., M., Hanadate, Y., Gilchrist, C. A., Crasta, O., Petri, Jr., W. A., Fei, Z., Trapaidze, N., and Nozaki, T. Diversity and significance of vesicular trafficking in *Entamoeba histolytica*. *Amebiasis Workshop 2010, "Molecular Approaches and Clinical Aspects"* September 22-24, 2010, Montreal.
- Penuliar, G. and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. *Amebiasis Workshop 2010, "Molecular Approaches and Clinical Aspects"* September 22-24, 2010, Montreal.
- Escueta-de Cadiz, A., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. *Entamoeba invadens*: Transcriptome analysis during encystation. 21st Molecular Parasitology Meeting, WoodsHole, Massachusetts, USA. September 12-16, 2010
- Nozaki, T., Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Yousuf, M. A., Nakada-Tsukui, K. Functional diversity of mitochondrion-related organelles in eukaryotes. 第33回日本分子生物学会年会、第83回日本生化学会大会 神戸、December 7-10, 2010 (WS 進化からみたタンパク質社会)
- Saito-Nakano, Y., Nakano, K., and Nozaki, T. Diversity of vesicular trafficking in phagocytic protozoa and significance of traffic in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Penuliar, G. M., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. Mechanism of trifluoromethionine resistance in *Entamoeba histolytica*. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan

- 10-12, 2011, Tokyo
- Escueta-de Cadiz, A., Nakada-Tsukui, K., Caler, E., and Nozaki, T. Entamoeba invadens: transcriptome analysis during encystation. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Furukawa, A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Trafficking mechanisms of phagosomal proteins in Entamoeba histolytica. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Mi-ichi, F., Yousuf, A., Makiuchi, T., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Gene silencing of mitochondrial proteins causes growth inhibition and suggests essentiality of mitochondria in Entamoeba histolytica. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Analysis of the protein import machinery in the Entamoeba mitochondrial remnant. The 45th US-Japan Cooperative Medical Science Program, Jan 10-12, 2011, Tokyo
- Makiuchi, T., Mi-ichi, F., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. Analysis of the protein import machinery in the Entamoeba mitochondrial remnant. Biology of Symbiosis: Memorial Symposium for the 26th International Prize for Biology-Celebrating Dr. Nancy A. Moran. December 7-8, 2010, Tsukuba, Japan.
- Yumiko Saito-Nakano, Mami Okada, Gil Mallari Penuliar, Yuki Hanadate, Carol A. Gilchrist, Oswald Crasta, William A. Petri, Jr., Zhangjun Fei, Nino Trapaidze, Tomoyoshi Nozaki. (2010) Diversity and Significance of Vesicular Trafficking in Entamoeba histolytica. Amebiasis Montreal 2010 Workshop. Canada, Montreal, Sept 22-24.
- Yumiko Saito-Nakano, Kentaro Nakano, Tomoyoshi Nozaki. (2011) Diversity of vesicular trafficking in phagocytic protozoa and significance of traffic in Entamoeba histolytica. The 45th Annual Japan-U.S. Joint Conference on Parasitic Diseases: Intestinal and Free-Living Protozoan Parasites Meeting
- 原田倫世、松崎素道、城戸康年、坂元君年、藪義貞、中井裕、北潔 Cryptosporidium parvum におけるシアン耐性酸化酵素 (Alternative oxidase, AOX) の生化学的解析: マイトソームへの AOX の細胞内局在 第 79 回寄生虫学会大会 平成 22 年 5 月
- Michiyo Harada, Motomichi Matsuzaki, Yasutoshi Kido, Kimitoshi Sakamoto, Yoshisada Yabu, Takashi Suzuki, Yutaka Nakai, Kiyoshi Kita. Biochemical analysis of alternative oxidase (AOX) in Cryptosporidium parvum: localization of AOX to mitosome XIIth International Congress of Parasitology. 2010. Aug
- Michiyo Harada, Motomichi Matsuzaki, Yasutoshi Kido, Kimitoshi Sakamoto, Yoshisada Yabu, Takashi Suzuki, Yutaka Nakai, Kiyoshi Kita. Biochemical analysis of alternative oxidase (AOX) in Cryptosporidium parvum: localization of AOX to mitosome. Second International Conference on Climate Change and Neglected Tropical Diseases. 2010 Sep.
- G. 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

エイズの粘膜ワクチンの創製と評価系の基盤構築

所 属 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部

研究代表者 三隅 将吾

研究要旨 組織学的な解析により、ウイルスの経膣感染に重要になると考えられる内子宮口組織における特徴的な形態を見出した。さらに、現在開発中の粘膜ワクチンはモデルウイルスの感染を防止する抗体を誘導できる優れた免疫原性を有していることが示唆された。

研究分担者

- (1) 国立感染症研究所 仲宗根 正
- (2) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部 庄司省三
- (3) 国立大学法人 熊本大学大学院生命科学研究部 高宗暢暁
- (4) 株式会社 新日本科学 高橋義博

A. 研究目的

HIV 初発感染部位である粘膜を標的とした粘膜ワクチンの評価系の基盤構築を目指し、実際に構築した霊長類モデルで粘膜を標的とした新規治療戦略開発を試みることを目的とする。その背景として、最近の研究で従来の血液中を循環する獲得免疫系の主役である CD4 陽性 T 細胞のみならず、粘膜に局在する CD4 陽性マクロファージ・樹状細胞や CD4 陽性 NKT 細胞等もまた重要な HIV の標的であり、これらの細胞における HIV 感染を制御することもエイズワクチン開発のためには重要であると考えられていることや HIV 感染伝播の大半が異性間性交渉による感染であるためである。しかし、HIV の初発感染部位である粘膜における HIV 感染標的の実態に関する研究は十分であるとはいえないため、粘膜を標的とした抗エイズ薬開発のための基盤技術の開発が望まれている。実際、粘膜を標的としたワクチン開発にあたり、それら

を評価する霊長類モデルは、一般的なワクチンに対する霊長類モデル評価系と比べ十分整備されていない。例えば、SIV をモデルウイルスとして用いた場合の感染条件の検討（ウイルス摂取量・回数等・感染の種類）、使用する霊長類の種類と生息地の違いによるチャレンジウイルスの感染効率の差違、粘膜感染ルートの実態把握、粘膜における感染標的の解明等を含めた早期基盤整備が求められるといえる。したがって、本研究では中国産アカゲザルを用いて HIV 初発感染部位である粘膜を標的とした粘膜ワクチンの評価系の基盤構築と粘膜を標的とした新規ワクチン開発を試みている。以下に本年度得られた知見について報告したい。

B. 研究方法

1) 生理的内子宮口ヘルニアの観察 (仲宗根)

生理的内子宮口ヘルニアの観察のためには、無麻酔下、サルに必要以上にストレスをかけないようにケアしながら固定具に固定し、短時間で内視鏡で子宮口付近の動画を撮影した。詳細は、仲宗根 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

2) 組織学的解析-精液の膣内 SIV 標的細胞への影響- (仲宗根)

サル (カニクイサル、♂、3.5kg) から得られた

精子(5000 万個)をカニクイザルに接種し、24 時間後臍部位の凍結切片を作製し、CD4 抗体、CCR5 抗体、CD3 抗体、CD20 抗体、fascin 抗体、CD1 抗体で染色後、キーエンス BZ-9000 にて観察を行った。詳細は、仲宗根 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

3) 精子と SIVmac239 の結合実験 (仲宗根)

詳細は、仲宗根 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

4) CCR5 をミミックした環状抗原 cDDR5、外被糖タンパク質 gp140 及び粘膜アジュバントを結合させた粘膜ワクチン抗原の創製 (庄司)

昨年度の研究報告書に詳細に記載したとおり、本年度もコア抗原 (高分子 PEG) に TGDK、アカゲザル CCR5 をミミックした cDDR5、CpG-ODN、SIVmac239 gp140 をコンジュゲートさせた。詳細は、庄司 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

5) パイプライン合成法(庄司)

合成した Hub 抗原 168mg に活性化した UPA 溶液を加え室温で 2 分間攪拌し、次に調製した活性化 TGDK 溶液を加え、さらに室温で 2 分間攪拌した。そこへ活性化 NTA 溶液を加えて室温で 12 時間反応させた。12 時間の反応後、1.1mmol の CpG-ODN 溶液を加え、室温で 48 時間反応させた。反応終了後、反応溶液に等量の二次水を加え、外液を二次水として 48 時間透析の後、凍結乾燥しこれら 4 つのワクチンコンポーネントを結合させた粘膜ワクチン抗原が得られた。次に、パイプライン合成法にならって、交差免疫反応の原因を明らかにするために、各コンポーネントを欠く抗原を作製した。詳細は、庄司 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

6) TGDK の液相大量合成法(庄司)

現在、熊本大学法人を介して特許申請のための手続き中につき詳細を公表することは、今回は差し控える

7) ENV ELISA plate の作製 (高宗)

COVALINK™ NH MODULE (Nunc) に PEG を用いて AB-NTA を結合させ、さらに AB-NTA と Ni の錯体形成を利用して調製した SIVmac239 gp140 を結合させた。詳細は、高宗 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

8) ENV ELISA (高宗)

詳細は、高宗 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

9) 抗体精製 (高宗)

抗体を含む抗血清を分画分子量 100000 の透析チューブで部分精製させるか、温度溶出型 Protein A カラムを用いて精製をかけ本年度の研究に用いた。詳細は、高宗 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

10) B-cell elispot assay (高宗)

U-Cytech 社の抗体産生 B 細胞の計数・同定ができる ELISpot キットを用いて測定した。詳細は、高宗 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

11) western immunoblot analysis (高宗)

HIV-1 defense vaccine によって誘導された抗血清中の抗 ENV 抗体が実際に、第三者が調製した ENV タンパク質に反応するかを検討した。ENV タンパク質は、NIH の AIDS reagent program から提供を受け、CHO 細胞で調製した SIVmac239 由来の

ENV タンパク質を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、抗血清を用いて解析を行った。詳細は、高宗 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

12) 中国産旧世界サル末梢血の採取及び PBMC 調製 (高橋)

中国産旧世界サル末梢血を密度勾配遠心する事により、PBMC を単離した。末梢血は、共同研究先である株式会社 新日本科学にて1頭あたり 10 mL 回収し、ヘパリン血として実験に用いた。インド産アカゲザル PBMC は、京都大学霊長類研究センターより 10 mL ずつ 2 個体分入手した。詳細は、高橋 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

13) SIVmac239 Nef 変異体及び Nef/Env 変異体の作製 (高橋)

Nef 変異体は親株である SIVmac239 にコードされている Nef タンパク質の MHC class I のダウンレギュレーション能といった機能を向上させた変異を導入している。さらに Nef/Env 変異体は、Nef 領域の変異に加え、ウイルス粒子内にウイルスのスパイクタンパク質の取り込みが向上する変異を Env 領域に導入している。各変異体のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、その培養上清からウイルスを回収した。詳細は、高橋 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

14) PBMC への SIV 感染及び培養上清回収 (高橋)

PBMC 1.0×10^7 cells あたり 120 ng p27 量のウイルスを IL-2 入りの培地で 500 μ L までメスアップしたものをを用いた。ウイルス溶液で懸濁した PBMC を 3,800 rpm (1,200 $\times g$) 1 時間遠心した (spinoculation)。遠心後、IL-2 入りの培地を 1.5 mL 加え、合計 2 mL (5.0×10^6 cells/mL) で培養した。以降、24 時間毎に上清を回収し、感染後 12

～14 日間培養を続けた。詳細は、高橋 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

15) MAGIC-5 assay を用いた感染価評価 (高橋)

MAGIC-5 細胞を 96 well plate に 1×10^4 cells/well で細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。次に、PBMC の培養上清を PBMC culture media containing DEAE 20 μ g/mL で 40 μ L まで希釈した後、その溶液を MAGIC-5 細胞の上清と置換した。37°C で 2 時間インキュベート後、culture media を添加して 48 時間培養した。培養後に感染細胞数を計数した。詳細は、高橋 H22 委託研究報告書を参照願いたい。

(倫理面への配慮)

1. 国立感染症研において、同研究所内に設置されている実験動物倫理委員会の規則に従ってサルに対する実験を実施した。
2. 新日本科学において、同研究所にある動物実験倫理指針の規則に従い、実験動物倫理委員会の指導のもと、実験を実施した。
3. 熊本大学実験動物倫理委員会の指針に則って動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に最大限努力し行った。

C. 実験結果

1) 経膣感染をモデルについて (仲宗根、高橋) :

宿主性防御因子の一つである遺伝子をホモで有する中国産旧世界サル個体の性周期をホルモン療法によりコントロールし個体間の性周期を同期化後、生理的条件下で子宮頸部の単層上皮細胞が露出している状態 (Fig. 1) で SIVmac239 Nef 変異体をウイルス感染源として精液とともに膣内へ曝露すると、ヒトにおける経膣感染を模倣したモデルの構築が可能であるという結論に現時点で至っている。仲宗根は、本年度 1) 中国産旧世界サルの性周期に伴って、ヒトと同様に生理的内子宮口ヘルニアがおこることを初めて明らかに

し、2)精液を中国産旧世界サルの上皮下に導入すると、粘膜直下に SIVmac239 の標的細胞である CD4+CCR5+T 細胞が誘導されることを明らかにできた。さらに 3) 中国産旧世界サル由来の精子は、SIVmac239 と直接結合できることを明らかにした。また、高橋は、宿主性防御因子の一つである遺伝子をホモで有する個体及び SIVmac239 Nef 変異体が攻撃接種ウイルスとして有用である可能性を示した。



Fig. 1 経膣感染モデルについて

2) 粘膜ワクチンについて (三隅、庄司、高宗) :

霊長類の膣内に精液を曝露することで、子宮頸部の単層上皮細胞直下における CD4+CCR5+細胞数が明らかに増加することや、ウイルスを粘膜面から進入させると体内からウイルスを排除することはきわめて難しいと考え、開発中の粘膜ワクチンによって抗 CCR5 抗体に加え広域中和能を有する抗 ENV 抗体を粘膜面に誘導できることを明らかにした (Fig. 2)。さらに、基礎免疫後抗 ENV 抗体を持続的に誘導させるための交差免疫抗原を見出した。平成 22 年度に見出した交差免疫抗原は、SIV ENV が CD4 分子と結合後に露出される部分 (Fig. 2) と相同性を有しており、交差免疫抗原に定期的に曝露されることにより、粘膜面に持続的に抗 ENV 抗体を誘導できる可能性がある。このことは、いつウイルスが膣に侵入してきたとしても、粘膜面から体内へ侵入させないということにつながると考えている。具体的に庄司は、粘膜ワクチン創製とともに、M 細胞標的分子-TGDK の液相大量合成に成功し、低コストでワクチンを作製させるというという命題に答える研究成果をあげた。高宗は、HIV-1 defense vaccine (Hub-9 抗原) で免疫された個体の骨髄に抗 ENV 抗体を産生できるメモリー B 細胞を誘導できることを B-cell elispot assay により本年度初めて明らかにした。さらに、三隅は、庄司、高宗の支援を受け、プロテオーム解析を駆使することにより、Hub-9 抗原で基礎免疫後、異種抗原を用いた交差免疫抗原によって抗 ENV 抗体を誘導できる抗原 (X-factor) を

特定できた。本抗原は、大量に入手可能な抗原であり、この発見により HIV が生体内に侵入する際に、あらかじめ抗 ENV 抗体および抗 CCR5 抗体の両方を誘導できることが可能であることを示唆している。

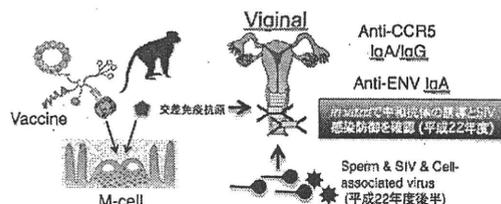


Fig. 2 粘膜ワクチンについて

D. 考察

中国産旧世界サルを用いて膣-子宮粘膜感染を達成するため、内視鏡観察を積極的に行った。本年度の技術的収穫は、直径 5 ミリ程度の内視鏡を用いて性周期に伴う、扁平上皮細胞および円柱上皮細胞の分布の変化等を詳細に観察できた。昨年度、巨大切片を用いた解析結果より、膣-外子宮口においては、物理的な障壁となる多重のケラチン層からなることから、SIV 感染のためには単層の上皮細胞等を介して、粘膜直下に侵入し、成立するであろうと予想され、SIV 感染は、主にこの領域で起こることが考えられたことから、内視鏡を用いて、単層上皮細胞の露出を詳細に確認し、個体にどのようなタイミングで感染源を接種するかを見極めることは、本邦における経膣感染モデルを完成させる上で重要な情報を提供したといえる。また、生理的な内子宮口ヘルニア現象はウイルス感染に極めて重要であると考えられ、安定的な膣-子宮粘膜感染を達成するためには、ホルモンによって内子宮口の性的な活動を高めることが肝要であると考えられる。そこで、現時点では、異性間性交渉による HIV 感染を霊長類モデルで評価するためには、生理的内子宮ヘルニア現象がみられている期間に、HIV free virus、HIV 感染細胞、精液の 3 つの因子を混合後、経膣感染用感染源として用いられるべきであることが示唆された。

本研究で調製した粘膜ワクチンを皮下投与および経口投与し血清および粘液中に誘導された抗体は、ウイルス感染防止効果を示した。この抗 gp140 抗体を持続的に誘導させるための交差抗原を本年度見いだすことができたために、今後

Hub-9 抗原で基礎免疫後、交差免疫抗原に日常生活の中で曝露される機会が、ワクチン接種者らに与えられれば、HIV が粘膜面に進入してきたとしても、事前に抗 gp140 抗体が誘導されているという状況を生み出せる可能性が示唆された。

E. 結論

サル膺-子宮組織の形態学的な詳細な観察により、内子宮口組織がウイルス感染に重要な領域であると考えられ、ホルモン療法により単層上皮を露出させた中国産旧世界サルを用いた経膺感染モデルの構築に有益な知見を得ることができた。

本研究で開発している粘膜ワクチンの中国産旧世界サルの免疫によって誘導される抗体には、ウイルス感染防止効果を示すことが明らかになり、また、それらの抗体を持続的に産生させるための交差免疫抗原を特定した。

F. 研究発表

論文発表

- 1) Misumi S, Inoue M, Dochi T, Kishimoto N, Hasegawa N, Takamune N, Shoji S. Uncoating of human immunodeficiency virus type 1 requires prolyl isomerase Pin1. *J Biol Chem.* (2010) 285(33):25185-95.
- 2) Anraku K, Fukuda R, Takamune N, Misumi S, Okamoto Y, Otsuka M, Fujita M. Highly sensitive analysis of the interaction between HIV-1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance. *Biochemistry.* (2010) 49(25):5109-16.
- 3) Ohya Y, Jono H, Nakamura M, Hayashida S, Ueda M, Obayashi K, Misumi S, Asonuma K, Ando Y, Inomata Y. Effect of recipient-derived cells on the progression of familial

amyloidotic polyneuropathy after liver transplantation: a retrospective study. *Ann Clin Biochem.* (2010) 47(Pt 6):529-34.

- 4) Takamune N, Kuroe T, Tanada N, Shoji S, Misumi S. Suppression of human immunodeficiency virus type-1 production by coexpression of catalytic-region-deleted N-myristoyltransferase mutants. *Biol Pharm Bull.* (2010) 33(12):2018-23.
- 5) Endo M, Gejima S, Endo A, Takamune N, Shoji S, Misumi S. Treatment of breast cancer cells with proteasome inhibitor lactacystin increases the level of sensitivity to cell death induced by human immunodeficiency virus type 1. *Biol Pharm Bull.* (2010)33(11):1903-6.
- 6) Zhang W, Tong X, Nakasone T, Yue XT, Yamamoto N, Liu XY, Yang RG. Activity of superior interferon a against HIV-1 in severe combined immunodeficient mice reconstituted with human peripheral blood leukocytes. *Chin Med J.* 2011 Feb;124(3):396-400.

学会発表

1. Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimer (TGDK) を用いた粘膜ワクチン開発
三隅 将吾, 野崎清輝, 松本 浩和, 甲斐 光, 松浦 薫, 高橋 義博, 増山 光明, 杉本 幸彦, 高宗 暢暁, 庄司 省三
平成 22 年度 日本生化学会九州支部例会抄録集 p.56 (2010)
2. HIV 感染防止粘膜ワクチンの創製-Absolute rejection vaccine を目指して
三隅将吾, 大坪 靖治, 野崎 清輝, 八城 勢

- 造, 高橋 義博, 増山 光明, 宗岡 篤信, 洲加本 孝幸, 福崎 好一郎, 杉本 幸彦, 高宗暢, 庄司 省三 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 p. 294(86) (2010)
3. 中国産アカゲザルへの馴化を目的とした SIV の増殖適応変異の解析
工藤康史、城戸啓嗣、大坪靖治、高橋義博、増山光明、宗岡篤信、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三、三隅将吾
第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集 p. 437(229) (2010)
4. HIV defense vaccine により誘導される抗 gp140 抗体の交叉免疫誘導
八城勢造、野崎清輝、三隅将吾、高橋義博、増山光明、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三
第 58 回日本ウイルス学会学術集会抄録集 p. 70 (2010)
5. 中国産アカゲザルへの馴化を目的とした SIV の増殖適応変異に関する研究
工藤康史、城戸啓嗣、大坪靖治、杉本幸彦、高宗暢暁、庄司省三、三隅将吾
第 27 回日本薬学会九州支部大会抄録集 p. 109 (2010)
6. Tetragalloyl-D-Lysine Dendrimer(TGDK)の M 細胞標的能の検討
甲斐光、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾
第 27 回日本薬学会九州支部大会抄録集 p. 108 (2010)
7. M 細胞標的 HIV 粘膜ワクチンの開発のための基礎研究
松浦薫、高宗暢暁、杉本幸彦、庄司省三、三隅将吾
第 27 回日本薬学会九州支部大会講演要旨集 p. 110 (2010)
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
- 1) 発明名称: TGDK の NK 増殖促進機能
出願番号: 熊本大学審査中
- 2) 国立感染症研究所職務発明承認(2010 年 3 月): 数珠多クローン遺伝子解析法
特許出願準備中: 数珠多クローン遺伝子解析

若手研究者奨励研究

サルエイズウイルスのヒトへの異種間感染伝播に関わる ウイルス側・宿主側制御因子の相互作用機構に関する 解析

所 属 東京医科歯科大学 ウイルス制御学分野
研究代表者 武内 寛明
研究期間 平成20年4月～平成23年3月

研究要旨：サルエイズウイルスのヒト細胞への感染伝播を制御する細胞内因子探索の結果、chaperon family である CypA および CypB 分子が細胞内抑制因子として機能することを明らかにした。

研究分担者
特になし

A. 研究目的

本研究は、サルエイズウイルス (SIV) が宿主域を乗り越えて、ヒトに感染伝播してきた機構を明らかにすることであり、新興・再興感染症に対するヒト宿主防御機構に対する理解を深めることが目的である。

B. 研究方法

(1) ウイルス DNA を定量するリアルタイム PCR 法：SIVagm および SIVmac239 株各々の gag 領域に特異的なプライマーおよび蛍光プローブを作製した。定量する際に用いるウイルス DNA スタンダードとして、段階希釈した既知量の SIV 分子クローンを含む非感染細胞ゲノム DNA を用いた。

(2) SIV ストックの作製：ヒトおよびサル T 細胞から産生された SIVagm および SIVmac239 を、SIV 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析に用いた。

(3) SIV 感染細胞内におけるウイルス DNA 合成量の解析：(2) で作製した SIVagm および SIVmac239 株を、ヒトおよびサル T 細胞に感染させ、24 時間後の感染細胞内で、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量を、リアルタイム PCR 法にて測定した。

(4) SIV 増殖能の解析：ヒトおよびサル T 細胞株に対し、SIVmac239 および SIVmac239 株を感染させた。この際、シャペロン活性阻害剤である Cyclosporine A (CsA) 存在および非存在下でのウイルス増殖効率を見極めるために、経時的に培養上清を回収し、逆転写酵素 (RT) 活性を測定した。

(5) Cyclophilin A (CypA) および Cyclophilin B (CypB) 発現コンストラクトの作製：CypA および CypB 分子を発現するコンストラクトとして、pMACS Kk.HA(C) (Miltenyi Biotec GmbH) に CypA もしくは CypB 配列を組み込んだものを作製した (pMACS Kk.HA(C)-CypA or -CypB)。

(6) CypA および CypB 発現抑制 T 細胞株の作製：RNAi (RNA 干渉) 遺伝子抑制法を用いて CypA (CypA-KD) および CypB (CypB-KD) 発現抑制 T 細胞株を作製した。

(7) T 細胞への遺伝子導入法：Nucleofector Device を用いた Nucleofection 法にて、ヒトおよびサル T 細胞への遺伝子導入を行った。

(8) CypA および CypB 過剰発現 T 細胞の選別法：(6) の方法にて遺伝子導入した細胞を選別するために、pMACS Kk.HA(C)-CypA/CypB から細胞表面に発現するマウス H-2K 分子を利用した細胞分離法を用いた。具体的には、マウス H-2K 分子に対する抗体を結合させた磁気ビーズ (MACSelect Kk MicroBeads) を用いて磁気分離を行い、H-2K 発現細胞を選別した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、研究開始段階において、必要に応じた東京大学医科学研究所の機関承認および文部科学大臣承認を既に取得した上で、研究を遂行した。

C. 研究結果及び考察

ヒトおよびサル T 細胞株から産生される SIV 粒子内に取り込まれる宿主因子として、Cyclophilin A (CypA) を同定した。次に CypA の機能阻害剤であり免疫抑制剤である

Cyclosporine A (CsA) によって、CypA の SIV 感染に対する効果を検討したところ、CsA はヒト T 細胞への SIV 感染を促進するが、サル T 細胞へのそれは抑制することを見出し、CypA を含む CsA に影響を受ける宿主因子が SIV トロピズムに関与している可能性を見出した。具体的な成果としては、(1) ヒトおよびサル T 細胞株への SIV 感染に対する CsA の影響は感染標的細胞側に依存すること、(2) CsA の影響を受ける SIV 生活環は主に逆転写反応過程であること、(3) CypA 遺伝子発現抑制ヒト T 細胞株における SIV 感染効率は通常 T 細胞と比較して上昇すること、等を明らかにした事が挙げられる。しかし、SIV 感染に対する CsA の効果を CypA 分子機能だけでは説明する事が出来ず、CsA に影響を受ける別の宿主因子の存在が示唆された。

CsA に影響を受ける宿主因子(群)の中で、SIV 感染効率に影響をおよぼす宿主因子について、RNAi による遺伝子発現抑制法を用いて更に詳細に解析を進めた結果、(4) 別の cyclophilin 分子である cyclophilin B (CypB) が、ヒト T 細胞への SIV 感染効率を促進させる CsA の効果に大きく寄与している、すなわち、SIV 感染抑制ヒト細胞内因子であること、(5) CypB は、ヒト T 細胞への HIV 感染効率には影響を及ぼさないこと、等を明らかにした。このことは、CypB が SIV トロピズムに寄与していることを示唆している。また、サル T 細胞への SIV 感染に対する CypA および CypB の影響を解析するために、これら宿主因子を、サル T 細胞内に過剰発現する事によってその影響を検討した結果、(6) CypA および CypB 共に、サル T 細胞への SIV 感染効率に必須な宿主因子であることを明らかにした。しかしながら、ヒトおよびサル T 細胞における CypA および CypB のアミノ酸配列差異は認められなかったことから、CypA および CypB と相互作用する宿主因子の差異が、SIV トロピズムを規定していると考えられる。

D. 評価

1) 達成度について

サルエイズウイルスのヒトへの種間感染伝播に影響をおよぼすヒト宿主因子を探索する目的で研究を遂行した結果、シャペロン分子群(CypA および CypB) を同定した。特に、CypB は、サルエイズウイルス特異的増殖抑制ヒト宿主因子として機能することを明らかにした。これらの結果は、研究目的に対する顕著な研究成果であることを示している。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本事業により得られた研究成果である、「エイズウイルスに対するヒトシャペロン分子(CypA および CypB)の異なる作用機序」は学術的・国際的に先駆的成果であり、原著論文だけでなく、国際学会での口頭発表および招待講演を行うまでに至った成果である。また、シャペロン分子は、インフルエンザや肝炎ウイルス感染増殖にも影響を与える宿主因子であり、ウイルス感染症に対する普遍的な自然免疫因子であることが示唆されたことは、厚生労働行政における感染症予防・治療対策に有益な情報となることから、社会的意義の高い研究成果であると考えられる。

3) 今後の展望について

HIV および SIV 感染に対する CypA/CypB の機能差異をより詳細な解析を行うのと共に、ヒトおよびサル機能遺伝子抑制細胞ライブラリーを用いて、HIV および SIV 感染に対する更なる自然免疫因子を探索する。また、ウイルス側要因も馳せて見極めて行くために、HIV/SIV キメラウイルスを用いて解析を進めていく。将来展開として、当該研究にて同定した生体内分子を利用する新規エイズ治療法の基盤確立を目指した研究を遂行していく。

E. 結論

サルエイズウイルスに対するヒト自然免疫因子として、ヒトシャペロン分子(CypA および CypB) を同定し、その作用機序を明らかにした。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表	4件
原著論文による発表	0件
それ以外(レビュー等)の発表	2件

その主なもの

論文発表

武内 寛明. エイズウイルスの異種間感染メカニズム. *The Journal of AIDS Research* (日本エイズ学会誌). 11(2): 104-105, 2009.

武内 寛明, 俣野 哲朗. エイズウイルスの増殖機構の解析とその制御法の開発. *蛋白質 核酸 酵素* (共立出版). 54(8): 947-952, 2009.

学会発表

武内 寛明, 俣野 哲朗.

ヒト細胞におけるサルエイズウイルス感染増殖能を規定するウイルス側領域の解析

第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月 7-9 日、徳島)

武内 寛明、石井 洋、俣野 哲朗。

Cyclophilins はエイズウイルストロピズムを規定する細胞内因子である

第 23 回日本エイズ学会学術集会 (2009 年 11 月 26-28 日、名古屋)

武内 寛明、石井 洋、俣野 哲朗。

エイズウイルストロピズムにおける Cyclophilins の役割

第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009 年 10 月 25-27 日、東京)

武内 寛明、石井 洋、桑野 哲矢、稲垣 奈都子、明里 宏文、俣野 哲朗。

Cyclophilin A はサルエイズウイルスの宿主域を規定する細胞内因子である

第 56 回日本ウイルス学会学術集会 (2008 年 10 月 26-28 日、岡山)

2) 海外

口頭発表	4 件
原著論文による発表	3 件
それ以外 (レビュー等) の発表	1 件

その主なもの

論文発表

Sugiyama R., Nishitsuji H., Furukawa A., Katahira M., Habu Y., **Takeuchi H.**, Ryo A., and Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry* 286(12):10051-7. 2011.

Ohmine S., Sakuma R., Sakuma T., Thatava T., **Takeuchi H.**, and Ikeda Y. The antiviral spectra of TRIM5α orthologues and human TRIM family proteins against lentiviral production. *PLoS ONE in press*. 2010.

Inagaki N., **Takeuchi H.**, Yokoyama M., Sato H., Ryo A., Yamamoto H., Kawada M., and Matano T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90. 2010.

Takeuchi H. Contribution of Cyclophilin A to determination of simian immunodeficiency virus tropism: A progress update. *Vaccine* 28 Suppl 2:B51-4. 2010.

Takeuchi H. and Matano T. Host factors involved in resistance to retroviral infection. *Microbiology and Immunology* 52(6):318-25. 2008.

学会発表

Takeuchi H. Species-specific Effect of Cyclosporine A on Simian Immunodeficiency Virus Replication: Possible Contribution of Cyclophilins to the Determination of Viral Tropism. China-Japan Research Collaboration on Emerging and Reemerging Infections, Beijing, China, 2009.

Takeuchi H., Ishii H and Matano T. Cyclophilin B has an inhibitory effect on SIV but not HIV-1 replication in human cells. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 2009.

Takeuchi H. Contribution of cyclophilin A to determination of simian immunodeficiency virus tropism. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Island, Japan, 2008.

Takeuchi H., Inagaki. N, H. Ishii, T. Kuwano, H. Akari and T. Matano. Cyclophilin A affects SIV replication positively in monkey but negatively in human cells. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses, New York, USA, 2008.

G. 知的所有権の出願・取得状況(予定を含む)
該当事項なし。

サルエイズウイルスのヒトへの異種間感染伝播に関わる ウイルス側・宿主側制御因子の相互作用機構に関する 解析

所 属 東京医科歯科大学 ウイルス制御学分野
研究者 武内 寛明

研究要旨：Cyclophilin B (CypB) のヒト T 細胞内における SIV 感染に対する影響を詳細に解析した結果、CypB はヒト T 細胞内における SIV 感染抑制因子であり、その作用機序はウイルス生活環の前期過程であることが明らかとなった。

A. 研究目的

以前から、HIV はチンパンジーを除くヒト以外の生物種において感染増殖することが出来ないことが知られており、そのため、HIV の宿主域は限定されていると理解されている。その宿主域の決定にはいろいろな宿主因子が関与していると考えられているが、近年の分子生物学的手法の発展により HIV 感染と宿主細胞との相互作用の解析が進んだ結果、様々な宿主因子が報告されてきた。その中で非常に興味深いのは、宿主細胞には、ウイルス増殖に必要な増殖必須因子だけでなく、ウイルス増殖を阻止する、すなわち増殖抑制因子をも備えていることが明らかとなってきたことである。具体的には、chaperon family に属する Cyclophilin A (CypA) は、ヒト細胞内において、HIV 感染を促進する宿主因子であり、CypA の HIV 感染増殖促進機能は、Gag 領域内のキャプシド (CA) 蛋白との相互作用によってウイルス粒子内に取りこまれた CypA と、感染標的細胞内の CypA が脱殻後の CA 蛋白と相互作用することによって発揮されることが明らかとなっている。一方、我々のこれまでの研究結果から、SIV がヒトへ感染伝播する際に、CypA が SIV 増殖抑制因子として作用しており、SIV Vif 蛋白がその機能を抑制していることを明らかにしている。当該事業では、平成 20 年度は、(1) ヒトおよびサル T 細胞株への SIV 感染に対する CsA の影響は感染標的細胞側に依存すること、(2) CsA の影響を受ける SIV 生活環は主に逆転写反応過程であること、(3) CypA 遺伝子発現抑制ヒト T 細胞株における SIV 感染効率は通常 T 細胞と比較して上昇すること、等を明

らかにした事が挙げられる。しかし、SIV 感染に対する CsA の効果を CypA 分子機能だけでは説明する事が出来ず、CsA に影響を受ける別の宿主因子の存在が示唆された。そこで、平成 21 年度は、CypA とは別の CsA 感受性 SIV 感染抑制因子の探索を行った結果、(1) chaperon family で CsA 感受性宿主因子は Cyclophilin B (CypB) であること、(2) CypB は、ヒト T 細胞への HIV 感染効率には影響を及ぼさないこと、等を明らかにした。さらには、(3) CypA および CypB 共に、サル T 細胞への SIV 感染効率に必須な宿主因子であることも明らかにした。このことは、CypB が SIV トロピズムに寄与していることを示唆している。本年度は、CypB の更なる詳細な解析を行うことで、その作用機序を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

(1) ヒト T 細胞株およびサル T 細胞株の培養：ヒト T 細胞株である CEM-SS 細胞は、10%ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地にて細胞培養した。サル T 細胞株においては、カニクイザル由来の HSC-F 細胞を、10%ウシ胎児血清、HEPES (10 mM)、2-mercaptoethanol (50 μ M) および IL-2 (10U/ml) を含む RPMI1640 培地にて細胞培養を行った。

(2) SIV および HIV ストックの作製：HeLa 細胞に pNL4-3、pSIVagm9063 および pSIVmac239 の各 DNA をトランスフェクションし、48 時間後の培養上清をウイルス感染実験に用いるストックとした。水疱性口内炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) を用

いたシュードタイプ HIV-1 および SIV については、VSV-G 発現プラスミドとエンベロープ欠損 HIV-1 もしくは SIV 発現プラスミドとを HeLa 細胞に遺伝子導入し、48 時間後の培養上清をウイルスストックとした。また、感染細胞内のウイルス DNA 合成量の解析を行う際は、DNaseI 処理を行った HeLa 細胞由来のウイルス、もしくはヒト CEM-SS 細胞およびサル HSC-F 細胞から産生されたウイルスをストックとして用いた。その際、ウイルス産生細胞として、CsA 存在 (2.5 μ M) および非存在下の各細胞を用いた。

(3) SIV 増殖能の解析: ヒト T 細胞株に、NL4-3、SIVagm および SIVmac239 株を感染させた。この際、CsA 存在 (2.5 μ M) および非存在下で感染細胞培養を行った。ウイルス増殖効率を見極めるために、経時的に培養上清を回収し、それに含まれるウイルス由来の逆転写酵素 (RT) 活性を測定した。

(4) ウイルス DNA を定量するリアルタイム PCR 法: NL4-3、SIVagm および SIVmac239 株各々の gag 領域に特異的なプライマーおよび蛍光プローブを用いて、感染細胞内にて合成されたウイルス DNA 量を定量した。定量する際に用いるウイルス DNA スタンダードとして、段階希釈した既知量の SIV および HIV 分子クローンを含む非感染細胞ゲノム DNA を用いた。

(5) ヒト T 細胞への遺伝子導入法
Nucleofector Device (Lonza Walkerrrrsville Inc.) を用いた Nucleofection 法にて、ヒト T 細胞への遺伝子導入を行った。

(6) CypA および CypB 過剰発現ヒト T 細胞の選択法

(5) の方法にてを遺伝子導入した細胞を選択するために、pMACS Kk. HA (C)-CypA から細胞表面に発現するマウス H-2K 分子を利用した細胞分離法を用いた。具体的には、マウス H-2K 分子に対する抗体を結合させた磁気ビーズ (MACSelect Kk MicroBeads) を用いて磁気分離を行い、H-2K 発現細胞を選択した。

(7) ウイルス粒子の精製

HIV-1 および SIVagm を感染させた CEM-SS 細胞か

ら産生されたウイルス粒子を、20%シュクロース / PBS (-) に重層した後、超遠心法 (35K rpm, 75 min) にてウイルス粒子を精製した。

(倫理面への配慮)

本研究における遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、必要に応じた東京大学医科学研究所および東京医科歯科大学の機関承認および文部科学大臣承認を既に取得済みであり、それらが定めたルールおよびガイドラインに沿って研究遂行を行った。

C. 研究結果

(1) ウイルス侵入経路に対する CsA の効果: ヒト T 細胞への SIV 侵入に対する CsA の効果を解析するために、水疱性口内炎ウイルス G 蛋白を用いたシュードタイプ HIV-1 および SIV を用いた感染実験を行った。その結果、HIV および SIV の侵入経路とは異なる経路を用いても、HIV および SIV 感染に対する CsA の効果に差異は認められなかったことから、HIV/SIV 感染に対する CsA の効果は、標的細胞侵入後に発揮されることが示唆された (図 1)。

(2) ヒト T 細胞への遺伝子導入法の検討: ヒト T 細胞内の CypA および CypB 分子の SIV 感染に対する影響については、CypA および CypB 発現抑制 T 細胞株を用いた実験を既に行っているが、RNAi 法による遺伝子発現抑制の標的配列特異性を見極めるために、CypA および CypB 分子を過剰発現させる実験 (off-target 効果を見極める) を行うための方法を検討することにした。具体的には、CypA および CypB 分子を発現するコンストラクト (pMACS Kk. HA (C)-CypA、pMACS Kk. HA (C)-CypB) を作製し、Nucleofection 法にてサル T 細胞への遺伝子導入条件を検討した。まず GFP 発現コンストラクト (pmaxGFP) を用いて条件検討を行い、GFP 発現効率をフローサイトメトリー (FACS) にて検討した。その際、SIV 感染に必要な CD4 分子が細胞膜表面上に維持される条件検討も同時に行った。最終的には、pMACS Kk. HA (C)-CypA および pMACS Kk. HA (C)-CypB によって細胞膜表面上に発現されるマウス H-2K 分子の発現効率も FACS を用いて確認した。その結果、ヒト T 細胞内への遺伝子導入かつ SIV 感染標的細胞

として機能し得る条件を見出す事が出来た (図 2)。

(3) CypA 過剰発現ヒト T 細胞の選択: ヒト T 細胞である CEM-SS 細胞へ pMACS Kk.HA(C)-CypA (CypA-HA) および pMACS Kk.HA(C)-CypB (CypB-HA) の遺伝子導入を行い、24 時間後にマウス H-2K 分子を発現する細胞を MACSelect Kk MicroBeads を用いた磁気分離法にて選択した。その結果、SIV 感染に必要な CD4 分子の発現効率に影響を与えず、H-2K 分子を発現している、すなわち CypA (図 2、CypA-HA パネル) もしくは CypB 分子 (図 2、CypB-HA パネル) を発現していることを示す CEM-SS 細胞を作製することが出来た。

(4) CypA および CypB 過剰発現ヒト T 細胞を用いた SIV 感染実験: ヒト T 細胞株への HIV/SIV 感染に対する CypA/CypB の効果を詳細に解析するために、(3) にて選択された CEM-SS 細胞を CsA 存在下 (2.5 μ M) もしくは非存在下において SIV を感染させた。24 時間後の感染細胞から DNeasy tissue kit (QIAGEN) を用いて Total DNA を抽出し、逆転写反応を経て合成されたウイルス DNA 量をリアルタイム PCR 法にて測定した。その結果、CypA 過剰発現環境下における HIV-1 感染効率については、ウイルス DNA 合成効率が上昇することが認められたが、(図 3、HIV-1 パネル、2 と 3、6 と 7 との比較) CypB 過剰発現系においては、HIV-1 cDNA 合成効率にほとんど差異は認められなかった (図 3、HIV-1 パネル、2 と 4、6 と 8 との比較)。また、CypA 発現抑制細胞 (CypA-KD CEM-SS 細胞) において、CypA を過剰発現 (再構築) した場合も HIV-1 cDNA 合成効率が上昇したことから (図 3、HIV-1 パネル、10 と 11 との比較)、CypA は、HIV 感染必須因子であることがより明確に示された。一方、SIV 感染については、CypA を過剰発現させても SIVcDNA 合成効率が上昇するよりもむしろ低下することが認められた (図 3、SIVagm パネル、2 と 3、6 と 7 との比較)、CypB を過剰発現させることで SIV cDNA 合成効率が更に低下することが認められた (図 3、SIVagm パネル、2 と 4、6 と 8 との比較)。また、CypB 発現抑制細胞 (CypB-KD CEM-SS 細胞) において、CypB を過剰発現 (再構築) させた場合も同様の結果が認められたことから (図 3、SIVagm パネル、14 と 16 との比較)、CypB は、SIV 感染抑制因子であり、その作用機序の一つ

が逆転写反応過程であることがより明確に示された。

(5) ヒト T 細胞における CypA および CypB のウイルス産生過程に対する影響: CypA および CypB がウイルス生活環における後期過程におよぼす影響を検討するために、CEM-SS、CypA-KD および CypB-KD CEM-SS 細胞に、pNL4-3 もしくは pSIVagm9063 を遺伝子導入し、72 時間後の培養上清中に産生されるウイルス量を、ウイルス蛋白量 (HIV-1 p24 抗原および SIV p27 抗原量) および逆転写酵素活性 (RT activity) により測定した。その結果、CypA/CypB によるウイルス産生に対する影響が認められなかったことから、ウイルス感染に対する CypA/CypB の作用機序は、ウイルス前期過程であることが示唆された (図 4)。

(6) CypA/CypB のウイルス粒子内への取り込みの有無: CypA/CypB のウイルス逆転写反応に影響をおよぼす作用機序を検討するため、ウイルス粒子内への CypA/CypB の取り込みの有無を検討した。その結果、ウイルス粒子内への取り込みは、HIV-1 および SIVagm とともに CypA のみが取り込まれることが明らかとなった (図 5)。この結果より、逆転写反応に対する CypB の作用については、標的細胞内の CypB が大きな影響をおよぼすことが示唆された。

考察

H20 年度は、Cyp の機能阻害剤である CsA を用いることで、CsA がヒトおよびサル細胞におけるウイルス感染増殖能に及ぼす影響を解析し、さらにヒト CypA と SIV との相互作用の更なる詳細な機能解析を行った。サルおよびヒトへの野生型 SIV 感染増殖に対する影響を解析した結果から、サル細胞では、CsA 存在下において増殖抑制側に作用し、ヒト細胞ではその粒子感染性および増殖効率をさらに上昇させることから、サル Cyp は SIV 増殖に必須であり、ヒト Cyp は野生型 SIV の増殖抑制因子として更に機能していることが示唆された。ところが、CypA 遺伝子をノックダウンしたヒト細胞を用いて SIV 感染実験を行ったところ、粒子感染性が上昇する結果が得られたが、CsA 処理によって更に上昇することが認められたことから、CsA の効果に対する CypA の寄与は部分的な

ものであることが示唆された。

そこで H21 年度は、CypA 以外の CsA 感受性宿主因子として CypB の機能解析を行った。その結果、CypB 遺伝子抑制ヒト T 細胞株 (CypB-KD CEM-SS) における SIV 感染増殖効率は明らかに上昇することから、SIV 感染に対する CsA のウイルス感染増殖促進効果に対する CypB の寄与が示唆された。また、CypB-KD CEM-SS 細胞における HIV 感染効率は、野生側 CEM-SS 細胞のそれと殆ど差異が認められず、CsA 存在下においては、HIV 感染増殖効率が著しく低下することから、HIV 感染に対する CsA の感染増殖抑制効果には、CypB ではなく、CypA が大きく寄与していることが示唆された。このことは、CypA/CypB が HIV/SIV トロピズムに寄与していることを示唆している。

次に SIV 感染増殖を促進する CypB 分子の機能を更に解析するため、H22 年度は、ウイルス感染標的細胞内の CypB 分子の機能解析を行う目的で、CypA/CypB の過剰発現環境下および CypA-KD/CypB-KD CEM-SS 細胞内における CypA/CypB の再構築を行い、HIV/SIV 感染に対する CypA/CypB 分子の影響を検討した結果、それらによって影響をうけるウイルス生活環は、主に逆転写反応過程であることが明らかとなった。更には、ウイルス産生効率に対する CypA/CypB の影響を検討した結果、ウイルス生活環における後期過程に影響をおよぼしていないことが示唆されたことから、CypB はヒト T 細胞内における SIV 感染抑制因子であり、その作用機序はウイルス生活環の前期過程であることが考えられる。

D. 結論

H22 年度は、ヒト細胞において CypA/CypB 分子が SIV 生活環において逆転写反応過程に大きな影響を及ぼす感染抑制因子であることを明らかにした。本研究成果は、エイズウイルスの異種間感染伝播において、Cyp が重要な役割を担っていることを示唆しており、エイズのみならず、新興および再興感染症、更には人畜共通感染症に対するヒト宿主防御機構に対する理解を深めるものと考えられる。

F. 研究発表

1 論文発表

Sugiyama R., Nishitsuji H., Furukawa A., Katahira M., Habu Y., **Takeuchi H.**, Ryo A., and Takaku H. Heat shock protein 70 inhibits HIV-1 Vif-mediated ubiquitination and degradation of APOBEC3G. *Journal of Biological Chemistry* 286(12):10051-7. 2011.

Ohmine S., Sakuma R., Sakuma T., Thatava T., **Takeuchi H.**, and Ikeda Y. The antiviral spectra of TRIM5 α orthologues and human TRIM family proteins against lentiviral production. *PLoS ONE* 6(1) e16121. 2011.

Inagaki N., **Takeuchi H.**, Yokoyama M., Sato H., Ryo A., Yamamoto H., Kawada M., and Matano T. A structural constraint for functional interaction between N-terminal and C-terminal domains in simian immunodeficiency virus capsid proteins. *Retrovirology* 7:90. 2010.

Takeuchi H. Contribution of Cyclophilin A to determination of simian immunodeficiency virus tropism: A progress update. *Vaccine* 28 Suppl 2:B51-4. 2010.

2 学会発表

国内学会

・口頭発表

ヒト細胞におけるサルエイズウイルス感染増殖能を規定するウイルス側領域の解析
第 58 回日本ウイルス学会学術集会 (2010 年 11 月 7-9 日、徳島)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

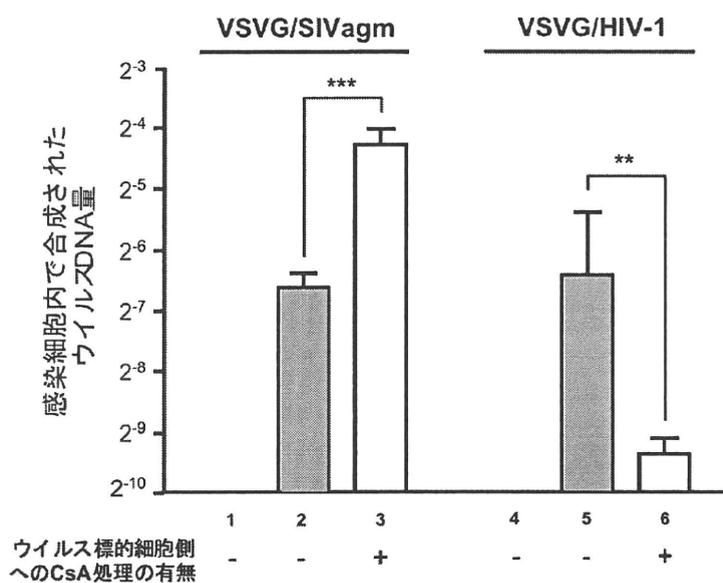


図1. シュードタイプウイルス感染標的ヒト細胞内におけるウイルス DNA 合成量の比較

HeLa 細胞から産生された VSVG/SIVagm (左側) および VSVG/HIV-1 (右側) を CEM-SS 細胞に各々感染させ、24 時間後の感染細胞内にて合成されたウイルス DNA をリアルタイム PCR 法にて測定した結果を示す。縦軸は相対的 DNA 合成量を示しており、ウイルス標的細胞側への CsA 処理は、ウイルス感染標的細胞に対し、ウイルス感染前に CsA (2.5 μM) を前処理していることを示している。

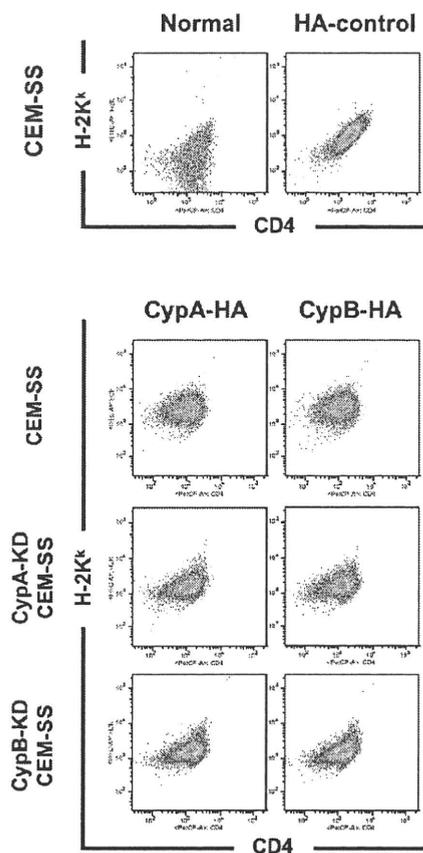


図2. ヒトT細胞 (CEM-SS) への CypA/CypB 発現コンストラクトの導入効率
 CEM-SS 細胞への CypA および CypB 分子発現コンストラクト (pMACS Kk.HA(C)-CypA および pMACS Kk.HA(C)-CypB) を Nucleofection 法にて遺伝子導入を行い、24時間後の細胞表面マウス H-2K 分子の発現効率をフローサイトメトリーにて解析した。横軸は細胞表面 CD4 分子の発現効率を表し、縦軸は H-2K 分子の発現効率を示している。