

201029016A

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22年度 総括・分担研究報告書

平成23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22年度 総括・分担研究報告書

平成23年 3 月

研究代表者 横 田 恭 子
(国立感染症研究所)

平成22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
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
上野 貴将	熊本大学エイズ学研究センター	准教授

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 9
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側因子の同定 17
研究分担者： 石坂 幸人
3. 宿主因子による HIV 抑制法の開発研究 25
研究分担者： 小柳 義夫
4. 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 31
研究分担者： 宮澤 正顯
5. ウイルスペクターワクチン抗原に対する免疫応答とHIV感染制御 35
研究分担者： 横田 恭子
6. OX40L/OX40を介するHIV感染増殖抑制の研究 41
研究分担者： 田中 勇悦
7. HIV-1感染における調節性T細胞の意義 45
研究分担者： 神奈木 真理
8. HIV感染の病態進行に関わる免疫関連宿主因子の研究 47
研究分担者： 立川 愛
9. 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 51
研究分担者： 有吉 紅也
10. CTLの多様性と抗HIV機能の制御 59
研究分担者： 上野 貴将

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 63

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および免疫応答の解析を行い、Vpu の抗 BST-2 作用や Vpr による double strand brake(DSB)を介した integrase 非依存性の HIV-1 挿入機構が明らかにされた。また、HIV-1 サブタイプ C 由来 Vif の強力な抗 APOBEC3 活性と低い G→A 変異率がサブタイプの異なるウイルスの多様性獲得に関わる可能性、APOBEC3 による感染防御がヒト化マウスやマウスレトロウイルス感染系で実際に機能していることが明らかにされた。一方、HIV-1 感染抵抗性を担う Rac2 高発現の作用機構が CCR5 とそのリガンドであるβ-ケモカインの高発現に依存すること、慢性感染者の抗 HIV-1 免疫応答の解析でもβ-ケモカイン産生と免疫病態との関係が明らかになるなど、ヒト化マウスを用いた R5 型優位な感染機構の解明も含めて R5 型 HIV-1 の感染はエイズ病態を理解する上で重要であり、OX40 シグナルを介したβ-ケモカイン産生増加は新たな治療法の開発につながると考えられる。更に、アジア人 CTL の HLA 拘束エピトープと病態に関わる情報が蓄積され、CTL の多様性の分子機構や調節性 T 細胞解析のモデルが作製された。

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）
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）
上野貴将（熊本大学エイズ学研究センター・准教授）

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) Myc タグ付加 BST-2 を特異抗体を用いて可視化し、EGFP 付加 Vpu との細胞内局在や細

胞内分解経路を顕微鏡で画像解析した。また、様々な HIV-1 サブタイプ由来 Vif を発現するインディケーター HIV-1 を作製し、ウイルスの感染性および細胞内 APOBEC タンパク量の違いを評価した（徳永）。2) 制限酵素 I-*SceI*あるいは I-*PpoI*部位を挿入した THP-1 細胞を作製し、制限酵素発現アデノウイルスと HIV-1 同時感染における DSB 誘導と HIV-1 組込の関係を解析した。また、Vpr 結合タンパク中の DNA の泳動度の変化に関わるトポイソメラーゼ I (TopoI) 特異的阻害剤の効果、および Vpr に親和性を示すペプチドを構成する SNF2h の DSB 誘導能を解析した（石坂）。3) 臍帯血 CD34 陽性細胞を免疫不全 NOG 新生児マウスに移植してヒト化マウスを作製し、野生型と Vif 欠損 HIV-1 (JR-CSF 株) を感染させた。経時的に採血し、脾臓の proviral DNA と血中ウイルス RNA の遺伝子配列を決定した。（小柳）。4) 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同定した *Rac2* 遺伝子の機能的イントロン多型に関し、高発現型の *Rac2* イントロンハプロタイプを持つ THP-1 細胞で siRNA による *Rac2* 発現抑制および CCR5 指向性 HIV-1 BaL 株の感染抑制効果を解析した。更に、健康人ボランティアから得た PBMC の *Rac2* イントロンハプロタイプを決定し、FACS で CCR5 及び CXCR4 の発現を調べた。野生型及び APOBEC3 ノックアウトマウスにフレンド白血病レトロウイルス (F-MuLV) を感染させ、細胞表面マーカーとウイルス *env* 遺伝子産物 SU タンパク質発現、ウイルス産生細胞数、ウイルス中和抗体価を測定した。（宮澤）。

抗 HIV 免疫応答の解析

5) 健康人 PBMC から CCR5 陽性細胞を純化し、異なる蛍光を発する組換え HIV-1_{NL-E} (X4)あるいは HIV-1_{NLAD8-D} (R5)型を *in vitro* で感染させて逆転写産物を定量した。また、*in vivo* ではヒト化マウスに両ウイルスを同時感染させ、CD4 細胞数が減少した時の感染細胞の分布を FACS で解析した。更に、野生型麻疹ウイルスの envelope を利用して活性化した SLAM 陽性の細胞を標的化する MV レンチウイルスベクターを作製した(横田)。6) PBMC を固相化抗 CD3 抗体で活性化し、R5 型(JR-FL)あるいは X4 型(NL4-3) HIV-1 を感染させて、OX40L 発現細胞や組換え OX40L (R&D 製)あるいは種々の抗体を添加して 37°C で培養した。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)。7) ラット脾細胞から IL-2 存在下でラット由来調節性 T 細胞株を誘導した。また、健康人由来 PBMC から CD4 陽性細胞を分離し、CD3/CD28 および retinoic acid 刺激を加え、TGF-beta と IL-2 存在下で誘導した。これらの細胞の表面抗原を FACS で、サイトカイン産生をエライザで測定した(神奈木)。8) 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、18 時間後に RNA を抽出して IFN- γ 、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、IL-17 をコードする遺伝子の mRNA 量を real-time PCR により定量した。また、PMA+ionomycin により刺激し、5 時間後にこれらのサイトカインに対する抗体を用いて細胞内染色した(立川)。9) 北タイランパン長期未発症 HIV 感染者で CD4+T cell>200/ul の 209 名(女性 159 名 男性 50 名)を含む、抗 HIV 薬未治療 HIV 感染者 557 名(女性 300 名 男性 257 名)を対象に HLA A、B、Cw アリール 4 桁の解析を行い、初診時に測定されたウイルス量との関係について ANOVA 統計解析を行った。アリール頻度とウイルス量との相関には、Spearman 解析を用いた。また、HLA B 及び Cw アリールと NK 細胞に関係する Bw4・Bw6、CC1・C2 の組み合わせとウイルス量についても ANOVA 統計解析を行った。更に、各 KIR 遺伝子多型を focus specific primer を用いた PCR によるジェノタイピングにて解析し、ウイルス量との関係について統計解析を行った。10) 様々な病態の HIV 感染者由来 CTL クローンから TCR をコードする遺伝子をクローニングした。この遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込んで T 細胞株に導入し、TCR の機能的再構築を行った。抗原ペプチドの各アミノ酸残基に一つずつ変異を導入した変異ペプチドライブラリーを合成した。(上野)。

(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に実施

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 が BST-2 と直接細胞膜で相互作用してライソゾーム分解へと導く過程を明らかにした。更に、部分的に関与する β TrCP 以外の宿主因子を探索した結果、Vpu の異なる機能に関与すると思われるタンパクを同定した(徳永)。HIV-1 subtype C 由来 Vif は抗 APOBEC 3G(A3G) 活性が高く、その N 末が A3G への強い結合と破壊に関わっていた。更に、内在性に A3G を発現している末梢血リンパ球での感染において、C-Vif の N 末 1-31 を有する HIV-1 では、B-Vif を有するそれと比較して、ウイルスの増殖効率は変わらないが、G \rightarrow A 変異率は遥かに低いことを明らかにした。2) PMA 処理 THP-1 に対して DSB 誘導後にウイルス感染を行うと、I-SceI および I-PpoI サイトへのウイルス挿入が Integrase(IN)非依存的に誘導され、HT1080 細胞株では、HIV-1 感染の約 0.5% が IN 活性非依存的挿入であった。また、Vpr によるプラスミド DNA 弛緩誘導に TopoI が関与していること、Vpr 結合蛋白質としてクロマチンリモデリング因子である SNF2h の Vpr 結合領域は N 末端アミノ酸 1-320 であること、SNF2h siRNA 導入下でも Vpr による DSB は阻害されないことを明らかにした(石坂)。3) ヒト化マウスで分化・成熟したヒト CD4 陽性 T 細胞は、ヒト末梢血中 CD4 陽性 T 細胞と同程度の APOBEC3 遺伝子を発現していた。野生型 HIV-1 はヒト化マウスで効率良くかつ持続的に増幅するのに対し、Vif 欠損 HIV-1 はまったく増幅しなかった。HIV-1 RNA では APOBEC3 によると考えられる変異の傾向はほとんど観察されなかったが、HIV-1 proviral DNA (逆転写酵素をコードする領域) では高頻度の G \rightarrow A 変異が確認され、生体内での HIV-1 複製は内在性の APOBEC3 分子群によって負に制御されることが強く示唆された(小柳)。4) 曝露非感染者ゲノムに特徴的な *Rac2* の第 5 イントロン遺伝子領域の多型はエンハンサー機能を有し、*Rac2* の高発現を抑制すると CCR5 の発現が増加する一方で 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。また、マウスレトロウイルス感染系では APOBEC3 がその生理機能として B リンパ球をレトロウイルス感染から護っていることが明らかとなった。

(宮澤)。

抗 HIV 免疫応答の解析

5) 活性化段階の異なる CCR5 陽性細胞における X4 あるいは R5 型 HIV-1 侵入後の逆転写の過程に差はなかったが、X4 と R5 型 HIV-1 を同時感染させた activated CCR5 陽性細胞では逆転写の進行は R5 型 HIV-1 の方が早く進む傾向にあった。また、ヒト化マウスに両ウイルスが同時感染した場合、R5 型と X4 型 HIV-1 の感染増殖は個体の T 細胞の分化・活性化状態に強く左右され、ヒトにおける HIV-1 感染初期の様々な病態を反映するモデルとして有用であることが明らかとなった。更に、MV レンチウイルスは SLAM 発現細胞に選択的に感染することを示した。(横田)。6) OX40 刺激は活性化した PBMC に β ケモカイン産生を誘導して抗 HIV-1 活性を発揮する。この時、抗 CD28 抗体による共刺激を加えると、OX40 の発現が増加し、R5 型 HIV-1 の感染増殖を強く抑制した。また、抗 CXCR4 mAb である A120 は X4 型 HIV-1 のみならず R5 型 HIV-1 の増殖抑制効果を有することが明らかとなった(田中)。7) ラット由来調節性 T 細胞株は HIV-1 に感受性がなく、HIV-1 評価系としては不適であった。一方、健康人 PBMC から誘導した CD4+CD25+Foxp3+ の T 細胞株は regulatory T 細胞に類似しており、HIV-1 に感染した(神奈木)。8) 血中ウイルス量の高い(HVL)あるいは低い(LVL) HIV 感染者間の免疫学的特性を比較した結果、CD4+T 細胞では MIP-1 α /MIP-1 β /RANTES は IFN- γ 産生細胞の一部により産生されており、IL-17 は別の細胞集団であった。一方、CD8+T 細胞においてはこれらのサイトカインは同一の細胞により産生され、HVL 群では CD8+T 細胞における IFN- γ 産生量が有意に低かった。また、刺激 18 時間後の PBMC におけるこれらサイトカイン遺伝子の発現は IFN- γ 遺伝子のみが HVL 群で有意に低下していた(立川)。9) HLA 保有者で有意にウイルス量低下が認められたのは、A 遺伝子座では A*2407、B 遺伝子座では B*3505、B*5701、C 遺伝子座では Cw*0406 と Cw*0602 であった。一方、A*1102、B*5601、B*0705、B*3802 では有意にウイルス量の増加が認められた。また、HLA 側では C2、NK 細胞側では KIR2DL3 非保有者にウイルス量抑制が確認された。(有吉)。10) Nef 特異的な CTL クロームは 2 つの集団で構成され、短い方の VY8 (VPLRPMTY) ペプチドは、感染早期の感染者、3 アミノ酸長い RY11 (RPQVPLRPMTY) ペプチドは、慢性感染期の感染者で主要な CTL の標的抗原であった。VY8 に特異的な CTL は、RY11 に特異的な CTL よりも HIV 感染細胞に対する傷害活性が高く、VY8 特異的 TCR 遺伝子の可変領域が共通した構造を有していたのに対し、RY11 特異的 TCR には構造的共通性は認められなかった。これらの TCR 遺伝子を TG40 細胞に導入し、Y11 ペプチドの各部位を他のアミノ酸に置換変異し

たペプチドライブラリーを作って TCR の交差反応性について解析した結果、VY8 特異的 TCR と比較して RY11 特異的 TCR は、TCR ごとに特徴的な交差反応性パターンを示した(上野)。

D. 考察

班全体の成果を総合的に判断すると、今後のエイズ治療法の開発に関する以下の論点が明確となった。

- 1) Vpu の抗 BST-2 活性の機構は明らかとなり、それを補助している細胞内タンパクの同定が新たな治療法に結びつくかもしれない。
- 2) Vpr による DSB を介した HIV-1 の integration は既存の IN 阻害剤では阻害できない可能性が指摘され、Vpr 阻害剤の開発が望ましい。
- 3) Vif が存在する状況においても内在性 APOBEC3 分子群によって HIV-1 複製が負に制御されることがヒト化マウスを用いた実験動物モデルにおいて明らかとなった。またマウスの系でも APOBEC3 による防御効果が示されている。従って、内在性 APOBEC3 の発現と機能を誘導する薬剤の開発は有望である。しながら、G \rightarrow A 変異率が低い HIV-1 サブタイプ C の増殖はサブタイプ B と同様であり、サブタイプ B ウイルスは A3G による中程度の変異を許容することにより、C よりもむしろウイルスの fitness や diversity を高めている可能性が指摘されている点は、注意を要する。
- 4) 慢性 HIV-1 感染者で β ケモカインの産生低下が病態進行に関わること、HIV-1 感染抵抗性に Rac2 高発現が結びつくしくみとして、CCR5 の発現低下とそのリガンドである β ケモカインの発現上昇が示されており、CCR5 指向性 HIV-1 の複製制御は重要である。ヒト化マウスを用いた R5 型優位増殖機構の解明や、OX40 系のシグナルを介して β ケモカインの産生を誘導する試みは新たな治療法の開発のための一つの方向性であることが認識された。
- 5) CTL が HIV-1 の制御に重要な役割を果たしていることは周知の事実である。アジアにおける慢性感染者の HLA 型とウイルス量や臨床像の大規模な統計解析から、防御に必要なウイルス抗原エピートプが同定されれば、HLA 型に合わせた CTL 誘導ワクチンがデザインされる。一方、HLA-B35 拘束性の CTL で明らかとなった CTL の多様性が、HIV 感染症の病態に与える影響については明らかでない面も多く、さらなる解析が必要であろう。

E. 結論

宿主因子によるウイルス制御の点では、Vpu の抗 BST-2 作用の機構や Vpr による double strand brake (DSB) が integrase 非依存性の HIV-1 挿入を誘導する機構が示された。また、

APOBEC3は実際に生体で抗ウイルス的に機能していることがヒト化マウスの系やマウスレトロウイルス感染系で明らかにされ、HIV-1 サブタイプ C 由来 Vif の強力な抗 A3G 活性と低い G→A 変異率がサブタイプの異なるウイルスの多様性獲得に関わることが示唆された。HIV-1 感染抵抗性に関わる Rac2 高発現の作用機構が CCR5 とそのリガンドであるβ-ケモカインの高発現に依存することが示され、多様な抗 HIV-1 免疫応答に関する解析でも、慢性 HIV-1 感染者におけるβ-ケモカイン産生と免疫病態との関係が明らかになってきている。従って、ヒト化マウスを用いた R5 型優位な感染機構の解明はエイズ病態を理解する上で重要であり、OX40 シグナルを介した CCR5 産生増加は治療法の開発につながると考えられる。更に、アジア人の感染制御に重要な CTL の HLA 拘束エピトープと病態に関わる情報が蓄積され、CTL の多様性の分子機構や調節性 T 細胞解析のためのモデル系が作製された。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwabu, Y., Kinomoto, M., Tatsumi, M., Fujita, H., Shimura, M., Tanaka, Y., Ishizaka, Y., Nolan, D., Mallal, S., Sata, T., and Tokunaga, K. Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J. Biol. Chem.* 285: 35350–35358. 2010.
- 2) Iwabu, Y., Fujita, H., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein Vpu. *Commun. Integr. Biol.* 3:366-369. 2010.
- 3) Ikeda, T., Abd El Galil, KH., Tokunaga, K., Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Heidmann, T., and Koito, A.: Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic Acids Res. in press.*
- 4) Okudaira, N., Iijima, K., Koyama, T., Minemoto, Y., Kano, S., Mimori, A., Ishizaka, Y. Induction of LINE-1 retrotransposition by FICZ, a candidate endogenous ligand of the aryl hydrocarbon receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(43):18487-92, 2010.
- 5) Hoshino, S., Konishi, M., Mori, M., Shimura, M., Nishitani, C., Kuroki, Y., Koyanagi, Y., Kano, S., Itabe, H., Ishizaka, Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J Leukoc Biol.* 87(6) 1133-1143, 2010.
- 6) 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*, 28S2:B32-37, 2010.
- 7) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Yamashita Y, Ohmichi M, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice. *J. Virol.* 84:9546-9556, 2010.
- 8) Kobayashi T, Ode H, Yoshida T, Sato K, Gee P, Yamamoto SP, Ebina H, Strebel K, Sato, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85: 932-945, 2011.
- 9) Takamura, S., S. Tsuji-Kawahara, H. Yagita, H. Akiba, M. Sakamoto, T. Chikaishi, M. Kato, and M. Miyazawa. Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J. Immunol.* 184:4696-4707, 2010.
- 10) Tsuji-Kawahara, S., T. Chikaishi, E. Takeda, M. Kato, S. Kinoshita, E. Kajiwara, S. Takamura, and M. Miyazawa. Persistence of viremia and production of neutralizing antibodies differentially regulated by polymorphic *APOBEC3* and *BAFF-R* loci in Friend virus-infected mice. *J. Virol.* 84: 6082-6095, 2010.
- 11) Sugimoto C., S. Watanabe, T. Naruse, E. Kajiwara, T. Shiino, N. Umamo, K. Ueda, H. Sato, S. Ohgimoto, V. Hirsch, F. Villinger, A. A. Ansari, A. Kimura, M. Miyazawa, Y. Suzuki, N. Yamamoto, Y. Nagai, and K. Mori. Protection of macaques with diverse MHC genotypes against a heterologous SIV by vaccination with a deglycosylated live-attenuated SIV. *PLoS One* 5: e11678, 2010.
- 12) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Yamamoto, T.: Mammalian microRNAs.: post-transcriptional gene regulation in RNA virus infection and therapeutic applications. *Frontiers in Microbiology* 1:1-9, 2010

- 13) Hagiwara, K., Murakami, T., Xue, G. Shimizu, Y., Takeda, E., Hashimoto, Y., Honda, K., Kondoh, Y., Osada, H., Tsunetsugu-Yokota, Y., and Aida, Y.: Identification of a novel Vpr-binding compound that inhibits HIV-1 multiplication in macrophages by chemical array. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403:40-45, 2010
- 14) Tsuruno C, Okuma K, Takahashi Y, Tanaka R, Tanaka Y., Takahama Y, Hamaguchi Y, Hamaguchi I, Yamaguchi K. A recombinant vesicular stomatitis virus encoding HIV-1 receptors and human OX40 ligand efficiently eliminates HIV-1-infected CD4-positive T cells expressing OX40. *Human Immunology*. in press.
- 15) Tanaka R, Takahashi Y, Kodama A, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Suppression of CCR5-tropic HIV type 1 infection by OX40 stimulation via enhanced production of β -chemokines. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 26(10): 1147-54, 2010.
- 16) Kodama A, Tanaka R, Zhang LF, Adachi T, Saito M, Ansari AA, Tanaka Y. Impairment of *in vitro* generation of monocyte-derived human dendritic cells by inactivated human immunodeficiency virus-1: Involvement of type I interferon produced from plasmacytoid dendritic cells. *Human Immunology*. 71(6): 541-50, 2010.
- 17) Ahmed, N., Hayashi, T., Hasegawa, A., Furukawa, H., Okamura, N., Chida, T., Masuda, T., and Kannagi, M. Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication in macrophages by commensal bacteria preferentially stimulating Toll-like receptor 4. *J Gen Virol*, 91: 2804-2813, 2010.
- 18) Hayashi, T., Nishitsuji, H., Takamori, A., Hasegawa, A., Masuda, T., and Kannagi, M. DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors enhances the transcription of HIV-1 through NF-kappaB. *Microbes Infect*, 12: 937-947, 2010.
- 19) Iwamoto A, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A. HIV-1 tropism. *Protein & Cell*. 1, 510-3. 2010
- 20) Koga M, Kawana-Tachikawa A., Heckerman D, Odawara T, Nakamura H, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Iwamoto A. Changes in impact of HLA class I allele expression on HIV-1 plasma virus loads at a population level over time. *Microbiol Immunol*. 54, 196-205. 2010
- 21) A Rojanawiwat, N Tsuchiya, P Pathipvanich, W Pumpradit, W-P Schmidt, S Honda, W Auwanit, P Sawanpanyalert, K Ariyoshi. Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. *International Health*. 2011 (in press)
- 22) 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; 5(6): e11179
- 23) Koizumi, H., Hashimoto, M., Fujiwara, M., Murakoshi, H., Chikata, T., Borghan, M.A., Hachiya, A., Kawashima, Y., Takata, H., Ueno, T., Oka, S., Takiguchi, M. Different in vivo effects of HIV-1 immunodominant epitope-specific CTLs on selection of escape mutant viruses. *J. Virol*. 84: 5508-5519, 2010
- 24) Motozono, C., Mwimanzzi, P., Ueno, T. Dynamic interplay between viral adaptation and immune recognition during HIV-1 infection. *Protein & Cell* 1, 514-519, 2010
- 25) Mwimanzzi, P., Hasan, Z., Tokunaga, M., Gatanaga, H., Oka, S., Ueno, T. Naturally arising HIV-1 Nef variants conferring escape from cytotoxic T lymphocytes influence viral entry co-receptor expression and susceptibility to superinfection. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 403, 422-427, 2010
2. 学会発表
- 1) Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Yoshitaka Tanaka, Tetsutaro Sata, and Kenzo Tokunaga: Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by HIV-1 Vpu. Centennial Retroviruses Meeting (CRM2010). April 29 – May 4, 2010, Prague, Czech Republic.
- 2) Kenzo Tokunaga: Battles between Host and Viruses: Molecular Mechanisms of the Inactivation of Antiviral Host Factors by HIV-1 Accessory Proteins. National Institute of Health, Thailand. Bangkok, Thailand. 2010.10.
- 3) 岩部幸枝, 藤田英明, 田中嘉孝, 佐多徹太郎, 徳永研三. HIV-1 Vpu による BST-2/tetherin の機能阻害に関与する cofactor の検索. 第 58 回日本ウイルス学会総会、2010 年 11 月、徳島.
- 4) 岩部幸枝, 佐多徹太郎, 徳永研三. BST-2/tetherin. 第 24 回日本エイズ学会シンポジウム[Restriction Factor]、2010 年 11 月、東京.
- 5) 岩部幸枝, 佐多徹太郎, 徳永研三. APOBEC3G の抗 Alu レトロ転移活性に関わる責任領域の同定. 第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月、神戸.
- 6) 岩部幸枝, 藤田英明, 田中嘉孝, 佐多徹太郎, 徳永研三. BST-2/tetherin の downregulation における HIV-1 Vpu の

- cofactor 要求性. 第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月、神戸.
- 7) 飯島健太、奥平准之、石坂幸人. DNA 二重鎖切断による LINE-1 のレトロトランスポジション誘導機構 (口頭) 日本放射線影響学会 第 53 回大会 (京都テルサ).2010/10/21.
 - 8) 飯島健太、奥平准之、石坂幸人. DNA 二重鎖切断は LINE-1 のレトロトランスポジションを誘導する. 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド).2010/12/9.
 - 9) Sato K, and Koyanagi Y. A novel HIV-1 infection model using humanized mice, 1st international young investigator symposium, Kumamoto, Japan, 2010.
 - 10) Sato K, Izumi T, Misawa N, Ito M, Takaori-Kondo A, Koyanagi Y. Evidence for HIV-1 G-to-A hypermutation in vivo by APOBEC3 proteins. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010.
 - 11) Kobayashi T, Yoshida T, Sato K, Peter Gee, Ebina H and Koyanagi Y. Characterization of species-specific interaction between Bst-2 transmembrane domain and HIV-1 Vpu in lipid bilayers of living cells. Retroviruses Meeting, Cold Spring Harbor, New York, 2010.
 - 12) Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Matsuoka M, Ito M, Koyanagi Y. Investigation of HIV-1 pathogenesis in humanized mice. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 2010.
 - 13) Iwami S, Sato K, Misawa N, Kobayashi T, Rob J. de Boer, and Koyanagi Y. DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse, the 2nd synthetic immunology workshop, Kyoto, Japan, 2010.
 - 14) Kobayashi T, Yoshida T, Sato K, Peter Gee, Ebina H and Koyanagi Y. Live cell-based mutagenesis studies reveals the structural insights for human tetherin recognition by HIV-1 Vpu. 11th Kumamoto AIDS Seminar Global COE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, 2010.
 - 15) Sato K, Izumi T, Misawa N, Kobayashi T, Ito M, Takaori-Kondo A, and Koyanagi Y. G-to-A mutations in HIV-1 provirus by APOBEC3 proteins contribute to abrogation of virus replication in humanized mice, 第 10 回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 淡路島, 2010.
 - 16) 佐藤佳, 岩見真吾, 三沢尚子, 伊藤守, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -動物実験-, 第 20 回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010.
 - 17) 岩見真吾, 佐藤佳, Rob J. de Boer, 小柳義夫. ヒト化マウス末梢血による DNA ラベリング系の確立 -数理モデル-, 第 20 回日本数理生物学会大会, 札幌, 2010.
 - 18) 小柳義夫, 小林朋子. HIV のアクセサリー蛋白質 Vpu とその阻害蛋白テザリン、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
 - 19) 小林朋子, 芳田剛, 佐藤佳, Peter Gee, 山元誠司, 蝦名博貴, 小柳義夫. HIV-1 Vpu 相互作用に必要な tetherin/Bst-2 膜貫通領域アミノ酸の同定, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、徳島、2010.
 - 20) 小林朋子, 大出裕高, 佐藤佳, Gee Peter, 山元誠司, 蝦名博貴, 佐藤裕徳, 小柳義夫. Human tetherin transmembrane domain is responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、2010.
 - 21) Sato K, Koyanagi Y, Remarkable and lethal G-to-A mutations in wild-type HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in infected humanized mice model. 第 24 回日本エイズ学会学術集会、東京、2010.
 - 22) Kobayashi T, Yoshida T, Sato K, Gee Yamamoto S, Ebina H, Koyanagi Y. Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. 第 33 回日本分子生物学会年会、神戸、2010.
 - 23) 宮澤 正顯. レトロウイルス遺伝子発現と糸球体病変: 拡大するヒトレトロウイルスの世界 (特別講演). 第 45 回日本小児腎臓病学会学術集会、2010 年 7 月、大阪.
 - 24) Kanari, Y., Hakata, Y., Wichukchinda, N., Irie, S., Biasin, M., Sakamoto, M., Tsuji-Kawahara, S., Takeda, E., Trabattoni, D., Piacentini, L., Fasano, F. R., Naddeo, V., Lo Caputo, S., Mazzotta, F., Rojanawiwat, A., Pathipvanich, P., Auwanit, W., Kohara, S., Sawanpanyalert, P., Ariyoshi, K., Clerici, M. and Miyazawa, M. High-level *Rac2* expression associated with novel intron polymorphisms restricts HIV-1 replication in exposed seronegative individuals. NEKKEN Research Conference "Ten years' achievements of the Lampang HIV cohort in Northern Thailand." October 27, 2010, Nagasaki, Japan.
 - 25) 宮澤 正顯, 博多 義之, 金成 安慶, 河原 佐智代. HIV 感染移行性の分子機構: *Rac2* と APOBEC3 (シンポジウム). 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2010 年 11 月. 東京.
 - 26) Tsunetsugu-Yokota, Y.: The impact of chemokine receptor usage of HIV-1 in the pathogenesis of HIV infection. The 10th Awaji International Forum on Infection and

- Immunity, Awaji, Japan, September, 2010.
- 27) Terahara, K., Ishige, M., Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Watanabe, S., Okada, S., Kobayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Characteristic activation/differentiation phenotype of CD4+ T cells and their distinct susceptibility to X4-type and/or R5-type HIV-1 infection in humanized NOD/SCID/Jak3-null mice. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
 - 28) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
 - 29) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, August, 2010.
 - 30) Tsunetsugu-Yokota, Y. and Terahara, K.: Factors crucial for the preferential propagation of R5-tropic HIV-1 in the early phase of HIV-1 infection. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
 - 31) Shibusawa, K., Mitsuki, Y-y, Terahara, K., Yanagi, Y. Kogayashi, K., Tsunetsugu-Yokota, Y.: Inhibition of HIV-1 replication by engineered lentivirus vectors: a potential advantage of SLAM-mediated virus entry. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
 - 32) Mitsuki, Y-y, Shibusawa, K., Tsuchiya, T., Terahara, K., Kobayashi, K., Takeda, M., Yanagi, Y., Tsunetsugu-Yokota, Y.: HIV-1 infection enhances the susceptibility of T cells to measles virus infection by upregulating signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) expression. The 5th Japanese-German HIV-Symposium, Tokyo, Japan, May, 2010.
 - 33) 石毛真行、寺原和孝、光木裕也、渋谷謙太郎、小林和夫、岡田誠治、横田(恒次)恭子: HIV-1 感染モデルとしてのヒト化マウスの妥当性と X4 および R5 HIV-1 感染, 第 58 回ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月。
 - 34) 渋谷謙太郎、光木裕也、寺原和孝、石毛真之、柳雄介、小林和夫、横田(恒次)恭子: 麻疹ウイルスエンベロープを用いた HIV-1 増殖抑制性レンチウイルスベクターの開発とその有効性、第 58 回ウイルス学会、徳島、平成 22 年 11 月。
 - 35) Tanaka Y, Tanaka R, Takahashi Y, Ansari AA. Suppression of CCR5-tropic HIV-1 infection by OX40stimulation via enhanced production of beta-chemokines. August 2010. Vol.22, Suppl 1, International Immunology. 14th international Congress of immunology Kobe, Japan. Day 4(4/5). Thursday, August 26 2010: 63. (PP-074-13)
 - 36) 田中礼子, 田中勇悦. TNF受容体スーパーファミリー分子OX40共刺激によるCCR5 HIVの感染抑制. 第63回日本細菌学会九州支部総会・第47回日本ウイルス学会九州支部総会・プログラム及び抄録, 2010.9.3-4: 宮崎県. 39.
 - 37) 深川耕次, 高馬卓也, 田中勇悦, 岸浩司, 高浜洋一, 浜口功, 大隈和. 活性化 T 細胞免疫刺激分子 OX40 を介した HIV-1 感染抑制効果の検討. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会・プログラム・抄録集, 2010.11.7-9 : 徳島県. 462.
 - 38) 田中勇悦. HIV 感染増殖を抑制する二つの方法: 樹状細胞ワクチンと OX40 刺激. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2010.11.24-26 : 東京都.305(97).
 - 39) 児玉晃, 田中勇悦, 田中礼子. エイズ免疫療法開発に向けた新規簡便樹状細胞分化養法の開発. 第 24 回エイズ学会学術集会・総会抄録集, 2010.11.24-26 : 東京都. 375(167).
 - 40) Ahmed N, Hayashi T, Hasegawa A, Furukawa H, Okamura N, Chida T, Masuda T, and Kannagi M. Potential control of HIV-1 replication in macrophages by commensal organisms stimulating TLR4. 第 14 回 国際免疫学会、2010 年 8 月、神戸
 - 41) Gu L, Kawana-Tachikawa A, Shiino T, Hosoya N, Nunoya J, Koibuchi T, Fujii T, Miura T, Matsushita M, Sugiura W, and Iwamoto A. Development of a PCR-SSOP-Liminex Assay for HIV-1 Drug Resistance. Session IV: Virology, Novel Therapies, and New Technologies. 24th Joint Meeting of the AIDS Panels, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. HIV Resistance: Impact in Asia. Grand Copthorne Hotel, Singapore. December, 2010
 - 42) Teeranaipong P, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Kondo N, Hoshino H, Matsuda Z, and Iwamoto A. Novel HIV-1 Phenotypic Tropism Assay without Pseudotyped Virions. Session IV: Virology, Novel Therapies, and New Technologies. 24th Joint Meeting of the

AIDS Panels, United States-Japan Cooperative Medical Science Program. HIV Resistance: Impact in Asia. Grand Copthorne Hotel, Singapore. December, 2010

- 43) Nakayama K, Kawana-Tachikawa A, Nakamura H, Miuta T, Fujii T, Koibuchi T, Iwamoto A. T cell activation and exhaustion associates with skewed cytokines/chemokines production in chronic HIV-1 infection. 14th International Congress of Immunology. Kobe, Japan. August, 2010
- 44) Nakayama K, Kawana-Tachikawa A, Nakamura H, Miura T, Fujii T, Koibuchi T, Iwamoto A. HIV-1 viral burden has an impact on Th1- and Th17-related cytokines/chemokines production of T cells. 18th International AIDS Conference. Wien, Austria. July, 2010
- 45) Masahiko Mori, Nuanjun Wichukchinda, Archawin Rojanawiwat, Reiko Miyahara, Michio Yasunami, Panita Pathipvanich, Pathom Sawanpanyalert, and Koya Ariyoshi: Favorable and unfavorable HLA alleles for HIV-viral control among CRF01_AE infected Thai population. CROI 2011, Boston USA.
- 46) 有吉紅也：シンポジウム 北タイ HIV コホートから学ぶエイズ免疫・病態. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2010 年 11 月 24 日-26 日.
- 47) 土屋菜歩、Panita Pathipvanich, Nuanjun Wichukchinda, Pathom Sawanpanyalert, 有吉紅也：北タイ政府系病院 HIV 外来における多剤併用療法の副作用と宿主遺伝子多型の関連. 第 24 回日本エイズ学会学術集会・総会, 東京, 2010 年 11 月
- 48) Mwimanzi, P., Oniangue-Ndza, C., Allen T.M., and Ueno, T. Nef activity in down regulation of viral receptors and protection of HIV superinfection is modulated by Nef mutations that confer CTL escape during acute infection. 11th KUMAMOTO AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Hotel Nikko Kumamoto and Aso Grand Vrio Hotel, Kumamoto, Japan, October 6-8, 2010.
- 49) Mwimanzi, P., Hassan R., Suzu S., Takiguchi M., Ueno T. The effects of CTL-escape conferring mutations on Nef's pathogenic functions in primary macrophages. 1st International Young Investigator Symposium, Gene Laboratory, Kumamoto University lecture hall, Center for AIDS Research, Kumamoto University, Kumamoto, Japan, March 4-5, 2010.
- 50) (5) Zafrul Hasan, Hiroyuki Gatanaga, Shinichi Oka, and Takamasa Ueno. Implication of the effects of host immune responses on the HIV-1 vpu gene evolution.

The 11th KUMAMOTO AIDS Seminar and GCOE Joint International Symposium. Hotel Nikko Kumamoto and Aso Resort Grandvrio Hotel, Kumamoto, Japan; October 6-8, 2010.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) CXCR4 指向性および CCR5 指向性 HIV-1 の感染を阻止する抗 CXCR4 抗体を利用した HIV-1 の感染阻止および治療、田中勇悦 (予定)
- 2) 「新規核移行ペプチド」石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡、PCT/JP2008/054563

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 協力研究員

研究要旨：ヒト抗ウイルス蛋白 APOBEC3G (A3G) 及び BST-2/tetherin (BST-2) とそれらを標的とする HIV-1 アクセサリー蛋白 Vif 及び Vpu について以下の機能解析を行った。(1) サブタイプ C 由来 Vif (C-Vif) が B 由来のそれに比べて高い抗 A3G 活性を持ち、C-Vif の N 末 1-31 領域が抗 A3G 活性に重要でかつ A3G への強い結合能を規定することを明らかにした。更に末梢血リンパ球に感染した C-Vif キメラ HIV-1 は B-Vif を有するそれに比べて低い G→A 変異率を示すことを見出した。以上より、異なるサブタイプ由来 Vif における異なる抗 A3G 活性が、*in vivo* におけるウイルスの適応性及び多様性に影響を与える可能性が示唆された。(2) Vpu による BST-2 の downregulation において、Vpu は細胞内のどの領域で BST-2 を標的とするかについて antibody internalization assay を用いて検証した。その結果、細胞表面で抗体に補足された BST-2 が、野生型 Vpu 存在下でのみ、経時的に細胞内に internalize して最終的にライソゾームと共局在する像が観察されたことから、細胞表面の BST-2 を Vpu が直接的に internalize させることを確認できた。(3) Vpu の抗 BST-2 活性は部分的に βTrCP に依存しているが、未知の宿主因子が関与している可能性が考えられる。BST-2 と Vpu の共発現細胞を用いて免疫沈降を行い沈降物のプロテオーム解析を行った結果、Vpu と相互作用する候補蛋白が得られたが、この候補蛋白のノックダウンで Vpu の抗 BST-2 活性に変化は認められなかったことから、この蛋白は Vpu の他の機能に関与している可能性が考えられた。

A. 研究目的

現在までに HIV-1 に対する抗ウイルス宿主因子として APOBEC3G (以下 A3G; Nature 2002. 418:646-50)、TRIM5α (Nature. 2004. 427:848-53)、BST-2/tetherin (以下 BST-2; Nature 2008; 451:425-30) が報告されている。そのうち TRIM5α については、ヒト型は HIV-1 複製抑制効果を示さないことから、ヒトが有している既知の抗ウイルス蛋白は A3G と BST-2 の 2 つである。この 2 つの宿主因子に対して、HIV-1 はアクセサリー蛋白 Vif 及び Vpu をそれぞれ備えている。

A3G はウイルス感染時に逆転写産物に G→A 変異を与えることによりウイルスの感染性を失活させる機能を持っている。一方で Vif はウイルス産生細胞において A3G をプロテアソ

ーム分解することにより、A3G がウイルス粒子中に取り込まれるのを防ぐ役割を担っている。Vif に関してこれまでに我々は、サブタイプ別分離株由来 Vif が異なる抗 A3G 活性を示すか否を検討して、サブタイプ C 由来 Vif (C-Vif) が最も強い活性を有すること、更に *vif* 遺伝子の組換え実験により C-Vif の N 末に責任領域があることを見出した。今回更にその領域を絞込むと共にその領域が担う機能的役割について検証することを目的とした。

BST-2 は産生されるウイルス粒子を細胞表面で繋ぎ止めてウイルス放出を抑制する。Vpu はそれを不活化してウイルス粒子放出を促進させる。Vpu が BST-2 を標的とする細胞内領域については、(i) 生理的エンドサイトーシスにより取り込まれた BST-2 を Vpu が細胞内で補

足する (ii) trans-Golgi から細胞膜へ輸送される BST-2 を Vpu が止める、という 2 つの異なる見解を幾つかのグループが示している。我々は昨年、Vpu が細胞表面の BST-2 を標的として downregulate することを、異なる 2 つの実験系を用いて間接的に証明した。今回更に画像解析により直接的に証明することを目的とした。

また我々は昨年度、Vpu の抗 BST-2 活性には、BST-2 との相互作用に必須の膜貫通領域 (TM) 以外に、細胞内領域 (CT) も重要であること、また Vpu による CD4 分解の場合と同様に、Vpu は CT の 52/56 番目のセリンを介したユビキチン複合体構成蛋白 β TrCP との相互作用が、BST-2 の機能阻害に必要であるが、 β TrCP 依存性は部分的であることを報告した。これらの結果より Vpu は CT に結合する β TrCP 以外の cofactor を要求性する可能性が考えられることから、本年度はこの cofactor を検索・同定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

サブタイプ B (NL)・C (02ZM-DBC33) Vif 間での N 末組換え体 DB(38-87)-Vif、DB(1-37)-Vif、DB(9-37)-Vif、DB(1-34)-Vif、DB(1-31)-Vif、DB(1-23)-Vif の作製を overlapping PCR により行った。作製した各 Vif 発現ベクターの遺伝子配列は ABI3130 シークエンサー (ABI) により確認した。

2. Vif 蛋白機能テスト

i) DNA トランスフェクション：ルシフェラーゼをレポーター遺伝子として有する Env・Vif 欠損型 HIV-1 cDNA クローン pNL-Luc-F(-)E(-) を 1 μ g の水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクター pHIT/G を 100 ng、A3G 発現ベクター pCA-hA3G-HA を 35 ng、野生型及びキメラ Vif 発現ベクターを 8 ng、empty pCAGGS を 857 ng、FuGENE6 (Roche) を用いて 3.5×10^5 個の 293T 細胞にトランスフェクションした。48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA Kit (Advanced BioScience Lab) により定量した。
ii) 感染性の定量：培養上清中の p24 量を測定後、1 ng p24 量のウイルスを、 1.75×10^4 個/ウェルで 96 ウェルプレートに蒔いた 293T 細胞に感染させた。48 時間後に 100 μ l のライシス

バッファー (Promega) を加えて細胞を溶解した。そのうちの 20 μ l を用いて、ルシフェラーゼ活性を Centro LB 960 (Berthold) により測定することにより、感染性を定量化した。

3. 免疫沈降法

T7 エピトープタグ付加 A3G 発現ベクター、FLAG タグ付加キメラ Vif-RRE 発現ベクター、及び Rev 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションして 36 時間培養した。更に MG-132 (20 μ M) 存在下で 9 時間培養した後、細胞溶解液を加えて遠心した上清を用いて、抗 anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) による免疫沈降反応を行った。抗 T7 タグ・モノクローナル抗体 (Novagen) を用いた沈降物のウエスタンブロットにより、A3G と Vif の相互作用を検討した。

4. G→A 変異アッセイ

50 ng p24 量のウイルスを、 1×10^6 個/ウェルで 12 ウェルプレートに蒔いた PHA 刺激末梢血単核球に感染させ、12 日後に DNeasy DNA 抽出キット (Qiagen) を用いてトータル DNA を抽出、env フラグメント (nt 8151-8756) を Expand High Fidelity DNA Polymerase (Roche) により PCR 増幅、TOPO TA-Cloning Vector pCR4 (Invitrogen) に挿入して、ABI3130 シークエンサー (ABI) により遺伝子配列を決定した。

5. Antibody internalization assay

直径 13mm のグラスカバースリップ (Nunc) 上の COS7 細胞に EGFP 付加野生型及び変異型 Vpu (Vpu-EGFP-RRE または CD4tmVpu-EGFP-RRE)、Rev 発現ベクター pCA-Rev、エンドサイトーシス不全 Myc タグ付加野生型 BST-2 発現ベクター pCA-BST-2-exMyc-Y6A/Y8A をトランスフェクションした。24 時間後に細胞を抗 Myc モノクローナル抗体 (Sigma) と 4°C または 37°C で 10 分間インキュベート、その直後 (0 min) またはライソゾームプロテアーゼ阻害剤 (40 μ M leupeptin 及び pepstatin A) 存在下で追加のインキュベート (20、50、または 80 min) 後に 4% パラフォルムアルデヒド固定、0.05% サポニン処理した。抗カテプシン D ポリクローナル抗体 (DAKO) 使用) 処理、その後 Cy3 または Cy5 標識抗マウス抗体 (Jackson

Immunoresearch Laboratory) で二次抗体処理して、DMRB 顕微鏡 (Leica) により観察した。

6. プロテオーム解析及び候補蛋白の機能解析

各 Vpu 発現ベクター (野生型 [WT: pCA-Vpu-RRE]、 β TrCP 結合不全変異体 [2/6: pCA-Vpu2/6-RRE] 及び CT 欠失変異体 [pCA-Vpu Δ CT-RRE])、Rev 発現ベクター及び Myc タグ付加 BST-2 発現ベクターを 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に抗 Myc ポリクローナル抗体 (Sigma) を用いて免疫沈降反応を行った。銀染色 (MS キット; Wako) 後、Vpu-WT 及び Vpu2/6 に存在、Vpu Δ CT には存在しないバンドの有無を確認し、LC-MS/MS (Aproscience) による候補蛋白質の同定を行った。

7. 候補蛋白の機能解析

候補蛋白 4 種類について siRNA を作製し、Cell Line Nucleofector Kit (Amaxa) により HeLa 細胞にトランスフェクション、24 時間後に野生型または Vpu 変異 HIV-1 を感染させて、48 時間後の上清中の p24 量の測定により、候補蛋白のノックダウンによる Vpu 機能阻害の有無を検証した。また候補蛋白 3 種類について、HeLa 細胞から抽出したトータル RNA より作製した cDNA をもとに PCR を行い、各フラグメントを C 末 HA タグ付加 pCAGGS に組込んで各発現ベクターを作製した。これらの発現ベクターと T7epitope 付加 Vpu 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションして、48 時間後に抗 T7 モノクローナル抗体を用いて免疫沈降反応を行うことにより Vpu との相互作用について検証した。

(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. C-Vif の抗 A3G 活性規定領域の絞込みと機能解析.

これまでに、HIV-1 サブタイプ C 由来 Vif 蛋白 (C-Vif) が高い抗 A3G 活性を持ち、それが

N 末領域に規定されることを明らかにしてきた。今回、更に細かく責任領域を絞り込むためにサブタイプ B/C キメラ Vif 発現ベクターを多数構築した。それらの発現ベクターを、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する Vif 欠損プロウイルス DNA、A3G 発現ベクター、VSV-G 発現ベクターと共に 293T 細胞にコトランスフェクションして、VSV-G シュードウイルスを作製、293T 細胞における感染性を比較した。その結果、C-Vif の N 末領域 1-31 を有する B/C キメラ Vif が C-Vif と同等の活性を示し、更にその N 末領域を狭めると活性が低下することから、N 末領域 1-31 のアミノ酸のクラスターが C-Vif の高い抗 A3G 活性を規定することが明らかになった。その領域が担う機能的役割を調べるため、A3G との結合能について検討した。キメラ Vif 発現ベクターと A3G 発現ベクターの 293T 細胞へのコトランスフェクション後に免疫沈降を行い、その結果、C-Vif の N 末領域 1-31 を有するキメラ Vif が A3G に対して強い結合親和性を示すことが分かった。このことから、この N 末領域が示す高い抗 A3G 活性は A3G への強い結合力に起因していることが明らかになった。更に末梢血リンパ球に感染した C-Vif を有する HIV-1 は、B-Vif を有する HIV-1 に比べて、ウイルスの複製効率においては同程度であるものの、低い G→A 変異率を示すことが分かった (Iwabu *et al.* J. Biol. Chem. 285: 35350-35358. 2010.)。

2. Vpu による細胞表面 BST-2 の直接的な internalization.

Vpu は膜貫通領域 (TM) を介して BST-2 と相互作用し、その機能を阻害してウイルス粒子放出を促進するが、Vpu による BST-2 downregulation のメカニズムは未だ不明である。我々は昨年度、Vpu が細胞表面 BST-2 を標的とすることを報告したが直接的な証明には至っていない。本年度は、antibody internalization assay により、Vpu が直接 BST-2 を細胞表面から downregulation するか否かを検討することを目的とした。Myc タグ付加エンドサイトーシス不全型 BST-2 変異体と野生型 Vpu 或いは TM 領域変異型 Vpu を内在性 BST-2 非発現型である COS7 細胞にコトランスフェクション、24 時間後に抗 Myc 抗体を 4°C または 37°C で 10 分

間反応させ、ライソゾーム阻害剤存在下で一定時間培養し、細胞表面 BST-2 に結合した抗体が細胞内に取込まれるか否かを間接蛍光抗体法で解析した。Vpu 変異体の共発現では、4°C または 37°C のどちらの温度で抗 Myc 抗体を反応させても細胞表面で BST-2 が検出された。一方、野生型 Vpu 共発現では、抗 Myc 抗体を 4°C で反応させた場合に BST-2 は検出されなかったが、37°C で反応させると BST-2 が細胞表面で検出された。更にライソゾーム阻害剤存在下での経時的な培養により、変異型 Vpu では BST-2 が細胞表面に留まるのに対し、野生型では BST-2 が細胞内に取込まれる像が観察され、最終的に Vpu 及びライソゾームマーカであるカテプシン D と共局在することが判った。この実験系により初めて、Vpu による BST-2 の細胞内陥入を画像解析で直接的に証明することに成功した (Iwabu *et al.* Commun. Integr. Biol. 3:366-369, 2010.)。

3. Vpu の抗 BST-2 機能に関する cofactor の検索。

我々は昨年度までに、Vpu による BST-2 の downregulation 及びライソゾーム分解は、ユビキチン複合体構成蛋白 β TrCP に依存することを証明した。しかしこの依存性は部分的 (~50%) で、Vpu の抗 BST-2 活性の約半分には、未知の宿主因子が cofactor として関与している可能性が示唆された。本年度、我々はプロテオーム解析によりこの cofactor を同定することを試みた。Myc タグ付加 BST-2 及び Vpu (WT、2/6、または Δ CT) 発現ベクターのコトランスフェクション後に、抗 Myc 抗体による免疫沈降反応を行った。沈降物を用いた SDS-PAGE 後の銀染色により、Vpu Δ CT では認められず Vpu-WT 及び Vpu2/6 においてのみ認められる特異的な約 80 kDa のバンドが検出された。これを切り出し LC-MS/MS 解析を行ったところ、9 種類 (A~I) の候補蛋白が得られた。そのうち Vpu や BST-2 とは異なる細胞内局在性をもつ核蛋白を除いたところ 4 種類の候補蛋白 (A、C、F、及び G) に絞られた。そこで候補蛋白の siRNA を作製して、それぞれ HeLa 細胞へのトランスフェクションを行い、それらの細胞に野生型または Vpu 変異ウイルスを感染させた。ノックダウン細胞における Vpu の抗 BST-2 効

果を、感染後のウイルス産生効率の比較により検証したが、いずれのノックダウン細胞においても、Vpu によるウイルス産生促進能において変化は認められなかった。一方で、候補蛋白の発現ベクターを作製して、Vpu 発現ベクターとのコトランスフェクション後に免疫沈降を行った結果、候補蛋白 A のみが Vpu との明らかな相互作用を示すことが分かった。以上の結果より、他の候補蛋白 (C、F、及び G) は Vpu と緩やかな相互作用を示す蛋白か、免疫沈降過程で精製しきれなかった夾雑物であり、候補蛋白 A については、Vpu の抗 BST-2 活性には影響しないものの、Vpu の他の機能に関与する可能性が推察された。

D. 考察

本年度は、2 つの抗ウイルス宿主因子 A3G 及び BST-2 と、それらを標的とする HIV-1 アクセサリー蛋白 Vif 及び Vpu の相互抑制作用のメカニズムについて検討した。

まず Vif について、我々は今回、C-Vif の N 末 1-31 領域が抗 A3G 活性を規定すること、その領域が A3G との強い結合親和性を有することを明らかにした。更に、内在性に A3G を発現している末梢血リンパ球での感染において、C-Vif の N 末 1-31 を有する HIV-1 では、B-Vif を有するそれと比較して、ウイルスの増殖効率は変わらないが、G \rightarrow A 変異率は遥かに低いことを見出した。これらの結果は、*in vivo* におけるウイルス適応性や多様性において、HIV-1 サブタイプ C ウイルスはサブタイプ B ほど flexible ではない可能性を示唆している。言い換えると、ウイルス複製においてサブタイプ C と遜色ないレベルを示すサブタイプ B ウイルスは、moderate な A3G 不活化能を示す自身の Vif が A3G による中程度の変異を許容することを利用して、むしろウイルスそのものの fitness 及び diversity をより高める可能性が考えられる。この可能性は、Vif 存在下での A3G による sublethal なレベルでの G \rightarrow A 変異は、十分な複製能をもつ子孫ウイルスの quasispecies 化に繋がる、という先頃の報告 (Sadler *et al.* J. Virol. 84, 7396-7404, 2010.) に矛盾しない。

Vpu が BST-2 を標的とする細胞内領域についてはこれまで、Mitchell ら (PLoS Pathog., 5:

e1000450, 2009.) が physiological にエンドサイトーシスされた BST-2 を Vpu が標的にすることを、Dube ら (PLoS Pathog. 6: e1000856, 2010.) が BST-2 の trans-Golgi network から細胞膜への移行を Vpu がブロックすること、を報告してきたが、我々は昨年報告 (Iwabu *et al.* J. Biol. Chem. 285: 35350–35358, 2010.) で、エンドサイトーシス全般を阻害する dominant-negative dynamin2 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、また BST-2 の clathrin 依存的エンドサイトーシス不全変異体を用いても依然 Vpu により downregulation されること、から Vpu は積極的に細胞表面 BST-2 を標的にして internalize すると結論付けた。しかしそれらは飽く迄も間接的な証拠であった為、今回、antibody internalization assay により直接的な証明を試みた。BST-2 の野生型 Vpu との共発現時、4°C ではなく 37°C で抗体を反応させると細胞表面 BST-2 を検出できることから、連続的に細胞表面に供給される *de novo* 発現の BST-2 が抗体に捕捉されることにより可視化が可能となることが考えられた。検出された BST-2 がその後、経時的に細胞内に取込まれ、最終的に Vpu と共にライソゾームに局在することから、Vpu が細胞表面の BST-2 を標的にし、生理的なエンドサイトーシスとは異なる経路で直接的にエンドサイトーシスを誘導した後に、BST-2 をライソゾーム分解へと導くことを明らかにすることができた。

Vpu のウイルス放出促進能、即ち抗 BST-2 活性における β TrCP 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 (約半分の) 依存性があるのみであることを昨年明らかにしたが、今年度は残り半分の抗 BST-2 活性を規定する Vpu の cofactor の検索を行った。Vpu 及び BST-2 共発現細胞における免疫沈降で Vpu-WT 及び Vpu2/6 に特異的な約 80 kDa のバンドが検出され、プロテオーム解析により同定されたものの中には実際、Vpu と相互作用する候補蛋白 A が含まれていた。しかしながら、その蛋白に特異的な siRNA によるノックダウンにおいて、Vpu の BST-2 阻害効果に全く影響がなかったことから、候補蛋白 A は実際に Vpu の何らかの機能に関与していると考えられるが、少なくとも BST-2 の抑制機

能には無関係であると結論付けられた。現在、いくつかの異なる手法を用いて cofactor の検索を続けている。

E. 結論

1. HIV-1 サブタイプ C 由来 Vif は N 末 1-31 領域が、強い A3G 結合親和性を有することにより、強力な抗 A3G 活性を示す。またその領域を持つキメラ HIV-1 は低い G→A 変異率を示す。
2. Vpu は細胞表面の BST-2 を標的として細胞内に internalize させ、ライソゾーム分解へと導く (今年度はこの現象を画像解析により直接的に証明した)。
3. Vpu がその抗 BST-2 活性において β TrCP 以外に要求する未知の宿主因子の検索を現在続けている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwabu, Y., Kinomoto, M., Tatsumi, M., Fujita, H., Shimura, M., Tanaka, Y., Ishizaka, Y., Nolan, D., Mallal, S., Sata, T., and Tokunaga, K. Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. **J. Biol. Chem.** 285: 35350–35358. 2010.
- 2) Kameoka, M., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Kameoka, Y., Sapsutthipas, S., Soonthornsata, B., Nakamura, S., Tokunaga, K., Sawanpanyalert, P., Ikuta, K., and Auwanit, W. The role of lysine residue at amino acid position 165 of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE Gag in reducing viral drug susceptibility to protease inhibitors. **Virology** 405:129-38. 2010.
- 3) Iwabu, Y., Fujita, H., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein Vpu. **Commun. Integr. Biol.** 3:366-369. 2010.
- 4) 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 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.* 84:4311-20. 2010.
- 5) Ikeda, T., Abd El Galil, KH., Tokunaga, K., Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Heidmann, T., and Koito, A.: Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* *in press*.
2. 学会発表
- 1) Yukie Iwabu, Hideaki Fujita, Yoshitaka Tanaka, Tetsutaro Sata, and Kenzo Tokunaga: Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by HIV-1 Vpu. Centennial Retroviruses Meeting (CRM2010). April 29 – May 4, 2010, Prague, Czech Republic.
- 2) Hideaki Fujita, Yukie Iwabu, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Keiko Fujimoto, Ryo Tachiyama, Daisuke Ishikawa, Masaki Matsumoto, Keiichi I Nakayama, and Yoshitaka Tanaka: Targeting of recycling endosomes to the cleavage furrow requires ubiquitylation of membrane proteins. Biochemistry and Cell Biology of ESCRTs in Health and Disease (ASBMB Special Meeting), October 14–17, 2010, Utah, USA.
- 3) Kenzo Tokunaga: Battles between Host and Viruses: Molecular Mechanisms of the Inactivation of Antiviral Host Factors by HIV-1 Accessory Proteins. National Institute of Health, Thailand. Bangkok, Thailand. 2010.10.
- 4) 岩部幸枝, 藤田英明, 田中嘉孝, 佐多徹太郎, 徳永研三. HIV-1 Vpu による BST-2/tetherin の機能阻害に關与する cofactor の検索. 第 58 回日本ウイルス学会
総会、2010 年 11 月、徳島.
- 5) 徳永研三, 岩部幸枝, 藤田英明, 田中嘉孝, 佐多徹太郎. HIV-1 Vpu による細胞表面 BST-2/tetherin の直接的な internalization. 第 58 回日本ウイルス学会総会、2010 年 11 月、徳島.
- 6) 亀岡正典, Panasda Isarangkura-na-ayuthaya, 亀岡陽子, Sompong Sapsuthipas, Bongkot Soonthornsata, 中村昇太, 徳永研三, Pathom Sawanpanyalert, 生田和良, Wattana Auwanit : CRF01_AE Gag 165 番目のリジン残基がプロテアーゼ阻害剤に対するウイルスの薬剤感受性を低下させる分子機構. 第 58 回日本ウイルス学会総会 (徳島) 2010. 11.
- 7) Piraporn Utachee, 中村昇太, Panasda Isarangkura-na-ayuthaya, 徳永研三, Pathom Sawanpanyalert, 生田和良, Wattana Auwanit, 亀岡正典 : Two N-linked glycosylation sites in Env gp120 regulate the susceptibility of CRF01_AE viruses to the CD4 binding domain antibody, IgG1 b12. 第 58 回日本ウイルス学会総会 (徳島) 2010. 11.
- 8) 池田輝政, Abd El Galil Khaled Hussein, 徳永研三, 前田和彦, 佐多徹太郎, 阪口薫雄, Thierry Heidman, 小糸厚. 哺乳類 APOBEC1 による内在性レトロエレメント制御機構の解析. 第 58 回日本ウイルス学会総会、2010 年 11 月、徳島.
- 9) 岩部幸枝, 佐多徹太郎, 徳永研三. BST-2/tetherin. 第 24 回日本エイズ学会シンポジウム[Restriction Factor]、2010 年 11 月、東京.
- 10) 岩部幸枝, 佐多徹太郎, 徳永研三. APOBEC3G の抗 Alu レトロ転移活性に關わる責任領域の同定. 第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月、神戸.
- 11) 岩部幸枝, 藤田英明, 田中嘉孝, 佐多徹太郎, 徳永研三. BST-2/tetherin の downregulation における HIV-1 Vpu の cofactor 要求性. 第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月、神戸.
- 12) Hideaki Fujita, Yukie Iwabu, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Keiko Fujimoto, Ryo Tachiyama, Daisuke Ishikawa, Masaki