

	n	セットポイント 血漿ウイルス量相乗平均	平均生存期間	3か月での 優位CTL標的抗原
A	6	10 ⁴	40か月以上	Gag Nef
E	6	10 ⁵	24か月	Nef
B	4	10 ⁵	(24か月)	(Vpx) Nef
J	4	10 ⁶	15か月	(Vif) (Nef)

図1. MHC-Iハプロタイプ別のSIV感染経過

上段：MHC-IハプロタイプA・E・B・Jを各々共有するアカゲサル群のSIVmac239感染9か月後の血漿ウイルス量の比較。多群解析で、J群はA群より有意に高い値を示した

($p = 0.0345$ by one-way ANOVA and Tukey-Kramer's multiple comparison test)。

下段：各群のセットポイントウイルス量の相乗平均概算値、平均生存期間および感染3か月後の優位なCTL反応の標的抗原を示す。

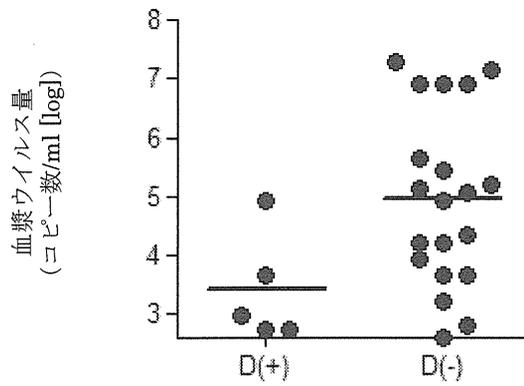
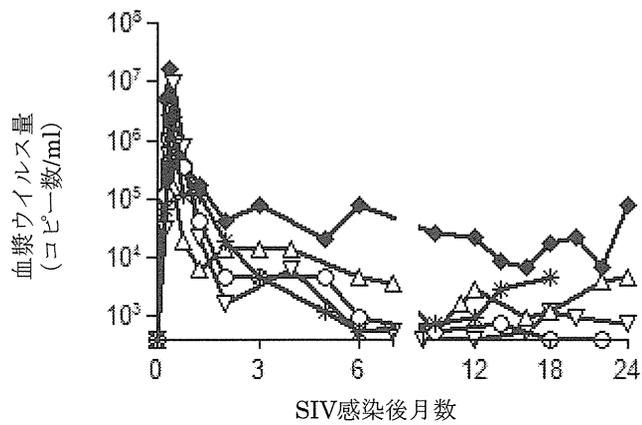


図2. MHC-IハプロタイプD共有群のSIV感染後血漿ウイルス量

上段：MHC-IハプロタイプD陽性サル群（5頭）のSIVmac239感染後の血漿ウイルス量の経時変化。

下段：D陽性群とD陰性群（20頭）の感染6か月後の血漿ウイルス量の比較。D陽性群はD陰性群より有意に低値を示した（ $p = 0.0360$ by t-test）。

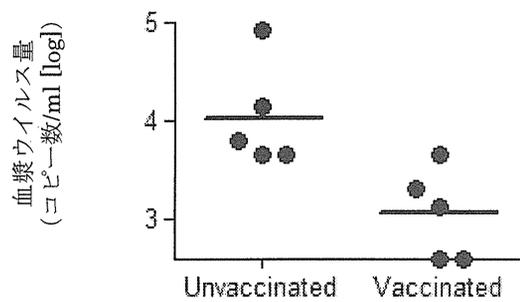
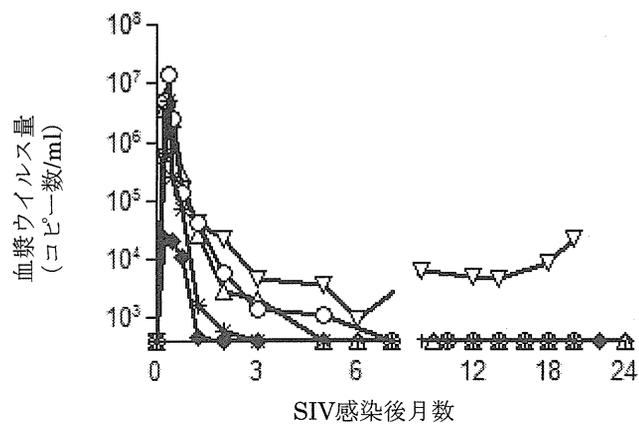


図3. ワクチン接種D陽性群のSIV感染後血漿ウイルス量

上段：DNA/SeV-Gagワクチン接種を受けたD陽性サル群（5頭）のSIVmac239感染後の血漿ウイルス量の経時変化。

下段：D陽性ワクチン接種群と非接種群の感染3か月後の血漿ウイルス量の比較。ワクチン接種群は非接種群より有意に低値を示した（ $p = 0.0149$ by t-test）。

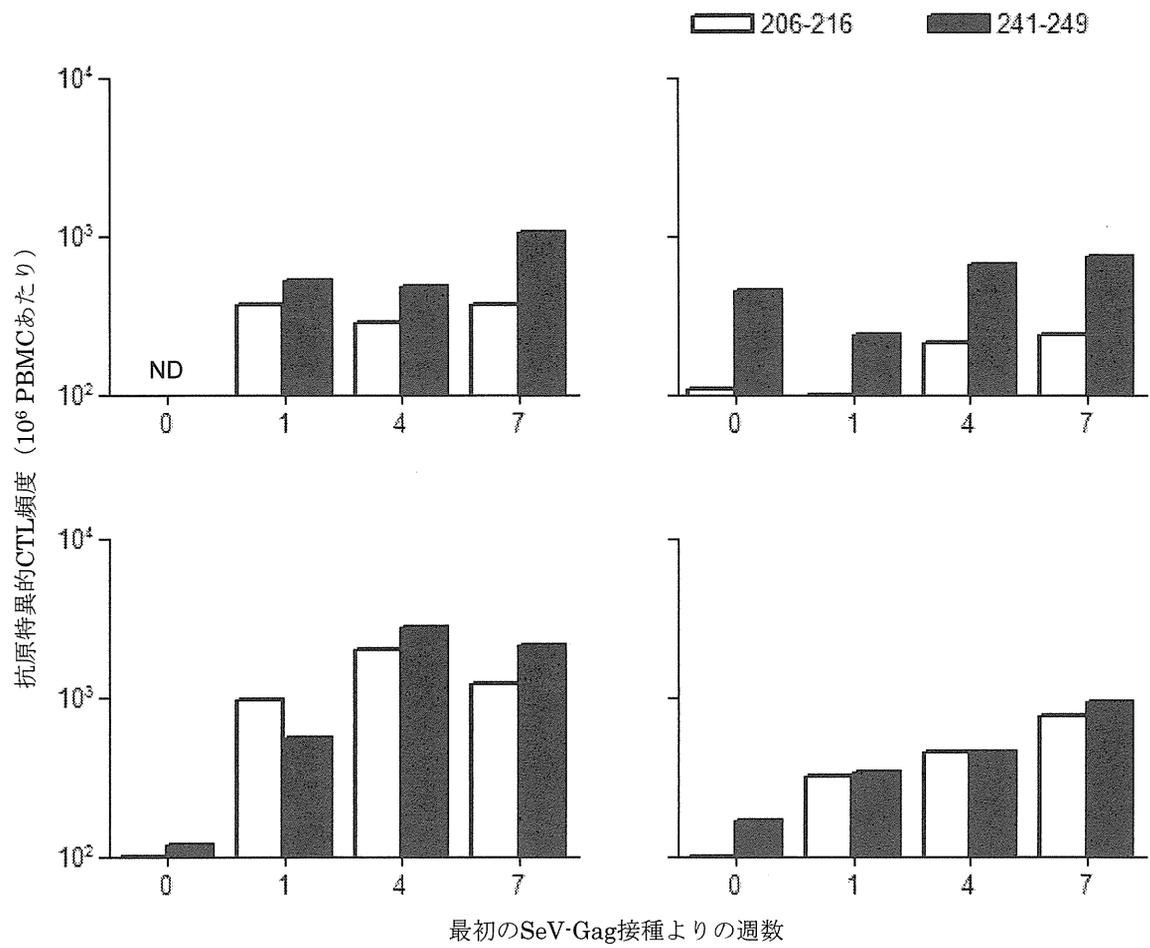


図4. SeVベクターの複数回接種効果

4頭のSIV複製制御サルの慢性期にSeVベクターを3週間隔で3回接種した。1回目の接種直前 (wk 0) および各接種後1週目 (wk 1・wk 4・wk 7) のGag206-216・Gag241-249特異的 CTL反応を示す。

厚生労働省科学研究補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

免疫誘導法に関する研究

研究分担者：保富康宏

医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター センター長

研究協力者：柴田宏昭

医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター プロジェクト研究員

研究要旨

エイズウイルスに対する感染防御では粘膜免疫を誘導するワクチンが重要である。本研究では経口感染を示す E 型肝炎ウイルス (HEV) のウイルス様中空粒子 (VLP) を用いて経口投与にてエイズウイルス特異的粘膜免疫の誘導を検討した。このシステムは異種蛋白由来の遺伝子を組み込むことで、VLP 表面に異種蛋白由来抗原エпитープを発現させる事が出来、発現させた抗原エピトープに対する特異的な免疫応答も誘導できる利点がある。サルを用いてこのシステムの有効性と安全性を検証した。

サルを用いた HEV-VLP 経口投与実験で、特に有害事象を生じず、HEV-VLP 特異的な液性及び細胞性免疫応答両者の誘導を確認出来た。HEV-VLP に封入させた DNA ワクチン投与実験で、Gag 特異的な細胞性免疫の誘導が確認された。経口投与で抗原特異的な粘膜応答の誘導が強く示唆された。

A. 研究目的

多くの感染症が粘膜より感染を示すが、エイズウイルスにおいても性交渉を主とした粘膜感染が最も問題となっている。感染を防ぐためにはウイルス進入経路である粘膜面での免疫反応が最も重要となるが、粘膜の免疫誘導は粘膜面に直接抗原を運び誘導することが必要である。また、粘膜の免疫反応は一箇所の粘膜で誘導された免疫反応が全身の粘膜に誘導されるという特徴を持つ。このことから最も簡便な粘膜免疫の誘導ワクチンは経口投与可能なものであると推察される。しかしながら経口投与では種々の酵素や極端な酸性状態等により、ワクチン抗原が抗原性を保持したまま免疫担当器官に到達させることは極めて困難である。本研究では経口感染を示す E 型肝炎ウイルス (HEV) のウイルス様中空粒子 (VLP) をベクターとし、経口投与可能な粘膜免疫

誘導型エイズワクチンの開発を試みた。

B. 研究方法

HEV-VLP 投与

カニクイザルに免疫する HEV-VLP は以下の 2 群に分けた。VLP に HIV-1Env エピトープを表出させた rVLP-Env (P18) 群、HIV-1 Env エピトープを持たない元の HEV-VLP (C52) 群。カニクイザル 2 頭(#1、#2)に P18 を、1 頭(#3)に C52 を VLP タンパク質量換算で 28.6 mg を 2 週間隔で 3 回、投与開始 30 週後の計 4 回経口投与し、経時的に採血した。HEV-VLP(C52) 又は P18 ペプチドを抗原とした ELISA により血中の特異抗体価を測定した。また、末梢血から常法によりリンパ球を分離し、C52 又は P18 ペプチドを用いて抗原再刺激を行い、ELISpot 法により抗原特異的な IFN- γ 産生細胞数を測定した。

HEV-VLP+DNA ワクチン投与

カニクイザルに免疫するワクチン HIV-1 Env エピトープを表出させた VLP(P18)に HIV-1 gag DNA ワクチンを封入したものを免疫した群(#1, #2)、HIV-1 Env エピトープを持たない元の HEV-VLP (C52) に HIV-1 gag DNA ワクチンを封入したものを免疫した群(#3)に分けた。カニクイザルへの免疫は経口投与により、VLP タンパク質量換算で 9.5 mg、封入された DNA 量が約 3 mg となるように調製し、2 週間隔で合計 3 回の免疫を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験の実施に当たっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管に関する基準」、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験棟の実施に関する基本指針」を遵守し、動物実験申請等の必要な委員会での承認は既に得ており、ヒトサンプル、情報等は一切用いていない。

C. 研究結果

カニクイザルに HEV-VLP (P18:#1, #2 又は C52:#3) を経口投与し、HEV-VLP、Env 特異的な免疫応答の誘導を試みた。免疫後のカニクイザルの日常観察や一般血液検査値に異常は無かった。HEV-VLP 特異的な抗体産生が認められた (図 1 A、B)。P18 を免疫したカニクイザルの血中には、Env 特異的な抗体は検出されなかった (図 1 C、D)。

HEV-VLP に対する特異的な INF- γ 産生細胞が認められたが (図 2 A)、Env 特異的な INF- γ 産生細胞については、C52 群も含めて検出された (図 2B)。

GagDNA ワクチンを封入した HEV-VLP (P18:#1, #2 または C52 : #3) を経口投与 4 週目の PBMC 中に、Gag 特異的な INF- γ 産生細胞が検出された (図 3)。

D. 考 察

粘膜免疫を誘導するためには抗原を直接、適切な形態で伝達しなければならず、それに加えて細胞性免疫を誘導するためには細胞質内での抗原発現が必要となる。これらのことから報告の最も多いのは呼吸器粘膜にウイルスベクターを用いてワクチンとする方法である。経口投与ワクチンは呼吸器粘膜を標的とした径鼻ワクチンに比べ、安全性や簡便性、多くのヒトを用いた治験が可能、乳幼児でも用意等の数多くの利点を持つ。しかしながら経口投与は数多くの酵素等の存在による消化器の状態から安定的に抗原を消化器粘膜に発現させることが極めて困難であると考えられてきた。本研究ではこの点を経口感染を示すウイルスである HEV-VLP を用いることで消化器粘膜に抗原を発現させることに成功した。しかしながら、HEV-VLP に付加した Env エピトープに対する免疫は追加免疫を行っても特異的な液性免疫は誘導されず、特異的な細胞性免疫の誘導も検証が必要と考えられる。投与した HEV-VLP に対して Env の蛋白量は少ないので、量的な問題で Env に対する免疫が誘導されなかった可能性もあるので、P18 の皮下接種によるコントロール実験を行い、この点を検証する予定である。HEV-VLP に封入した DNA ワクチンにより、特異的な細胞性免疫の誘導がわずかではあるが確認された。今後、免疫後半のサンプルについて液性免疫の誘導の有無や HEV-VLP に付加した Env の効果なども含めた解析を行って行く予定である。また、誘導が困難な HIV-1 に対する中和抗体の誘導の確認も行う必要がある。

E. 結 論

カニクイザルを用いて、Env エピトープを発現させた HEV-VLP に GagDNA ワクチンを封入した経口ワクチン開発の基礎的検討を行った。経口投与実験からは有害事象は生じず、HEV-VLP 特異的な液性、細胞

性免疫応答の両者を誘導した。HEV-VLP に封入された DNA ワクチン経口投与により、Gag 特異的な細胞性免疫の誘導も確認され、感染防御に重要な粘膜免疫の誘導が強く示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Kurosawa, T., Hamano, M., Higashimo, A., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I. and Akari, H. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection. *Archiv. Virol.* in press
- 2) Tougan, T., Aoshi, T., Coban, C., Katakai, Y., Kai, C., Yasutomi, Y., Ishii, K.J. and Horii, T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum. Vac. Immunother.* 2012 in press
- 3) Karamatsu, K., Matsuo, K., Inada, H., Tsujimura, Y., Shiogama, Y., Matsubara, A., Kawano, M. and Yasutomi, Y. Single systemic administration of Ag85B of mycobacteria DNA inhibits allergic airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Asthma Allergy* 2012;5:71-79.
- 4) Nomaguchi, M., Yokoyama, M., Kono, K., Nakayama, E.E., Shioda T., Saito, A., Akari, H., Yasutomi, Y., Matano, T., Sato, H. and Adachi, A. Gag-CA Q110D mutation elicits TRIM5-independent enhancement of HIV-1mt replication in macaque cells. *Microve. Infect.* in press
- 5) Yoshida, T., Omatsu, T., Saito, A., Katakai, Y., Iwasaki, Y., Iijima, S., Kurosawa, T., Hamano, M., Nakamura, S., Takasaki, T., Yasutomi, Y., Kurane, I. Akari, H. CD16 positive natural killer cells play a limited role against primary dengue virus infection in tamarins *Archives Virol* 2012;15:363-368.

- 6) Tajiri, K., Imanaka-Yoshida, K., Matsubara, A., Tsujimura, Y., Hiroe, M., Naka, T., Shimojo, N., Sakai, S., Aonuma, K. and Yasutomi, Y. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J. Immunol* 2012;189:2043-2053.
- 7) Uchida, A., Sasaguri, H., Kimura, N., Tajiri, M., Ohkubo, T., Ono, F., Sakaue, F., Kanai, K., Hirai, T., Sano, T., Shibuya, K., Kobayashi, M., Yamamoto, M., Yokota, S., Kuboddera, T., Tomori, M., Sakaki, K., Enomoto, M., Hirai, Y., Kumagai, J., Yasutomi, Y., Mochizuki, H., Kuwabara, S., Uchihara, T., Mizusawa, H. and Yokakota, T. Non-human primate model of ALS with cytoplasmic mislocalization of TDP-43. *Brain* 2012;135:833-846.
- 8) Saito, A., Kono, K., Nomaguchi, M., Yasutomi, Y., Adachi, A., Shioda, T., Akari, H. and Nakayama, E. E. Geographical genetic and functional diversity of antiretroviral host factor TRIM5 in cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* 2012;93:594-602.
- 9) Higashino, A., Sakate, R., Kameoka, Y., Takahashi, I., Hirata, M., Tanuma, R., Masui, T., Yasutomi, Y. and Osada, N. Whole-genome sequencing and analysis of the Malaysian cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*) genome. *Genome Biol.* 2012 Epub
- 10) Tachibana, S., Sullivan, S.A., Kawai, S., Nakamura, S., Goto, N., Arisue, N., Palacpac, N.M.Q., Honma, H., Yagi, M., Tougan, T., Katakai, Y., Kaneko, O., Mita, T., Kita, K., Yasutomi, Y., Kim, H.R., Sutton, P.L., Shakhbatyan, R., Horii, T., Yasunaga, T., Bamwell, J.W., Escalante, A.A., Carlton, J.M. And Tanabe, K. Plasmodium cynomolgi genome sequences provide insight into Plasmodium vivax and the monkey malaria clade. *Nature Genetics* 2012; 44:1051-105

2.学会発表

- 1) 渡邊健太、松尾和浩、保富康宏：ヒトパラインフルエンザ2型ウイルスをベクターとした粘膜免疫誘導型結核ワクチンの開発
第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜
2012年11月17-18日
- 2) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏：C型肝炎モデルマウスを用いた治療用DNAワクチンの検討 第16回日本ワクチン学会学術集会 横浜 2012年11月17-18日
- 3) 和田 剛、小原 道法、保富 康宏：HCV-DNAワクチンの細胞性免疫誘導能とC型肝炎モデルマウスを用いた治療効果についての検討 第60回日本ウイルス学会 大阪
2012年11月13-15日
- 4) 岡村 智崇、松尾 和浩、保富 康宏：強力な細胞性免疫を誘導する Ag85B 発現弱毒エイズウイルスの防御免疫機構の解析
第60回日本ウイルス学会 大阪 2012年11月13-15日
- 5) Okamura,T., Matsuo,K., Yasutomi,Y. : Induction of protective immune responses against pathogenic AIDS virus infection in monkeys infected with non-pathogenic AIDS virus carrying an adjuvant molecule.

第41回日本免疫学会 神戸 2012年12月5日-7日

6) TSUJIMURA,Y., YASUTOMI,Y. : Suppressive effects of Mycobacteria major secretion protein, Ag85B, to inflammatory responses in human bronchial epithelial cells.

第41回日本免疫学会 神戸 2012年12月5日-7日

7) Tajiri,K., Imanaka-Yoshida,K., Hiroe,M., Shimojo,N., Sakai,S., Aonuma,K., Yasutomi,Y.: Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Dendritic Cells Inhibits Myocardial Inflammation in Experimental Autoimmune Myocarditis. Basic Cardiovascular Sciences 2012 scientific sessions, 2012.7.23-26, New Orleans, USA

8) 田尻和子、下條信威、町野智子、酒井俊、今中一吉田恭子、廣江道昭、保富康宏、青沼和隆：スタチンはCD4陽性T細胞のTh1/Th17細胞への分化を抑制し心臓の炎症を制御する。第16回心血管内分泌代謝学会、2012.11.23-24、東京

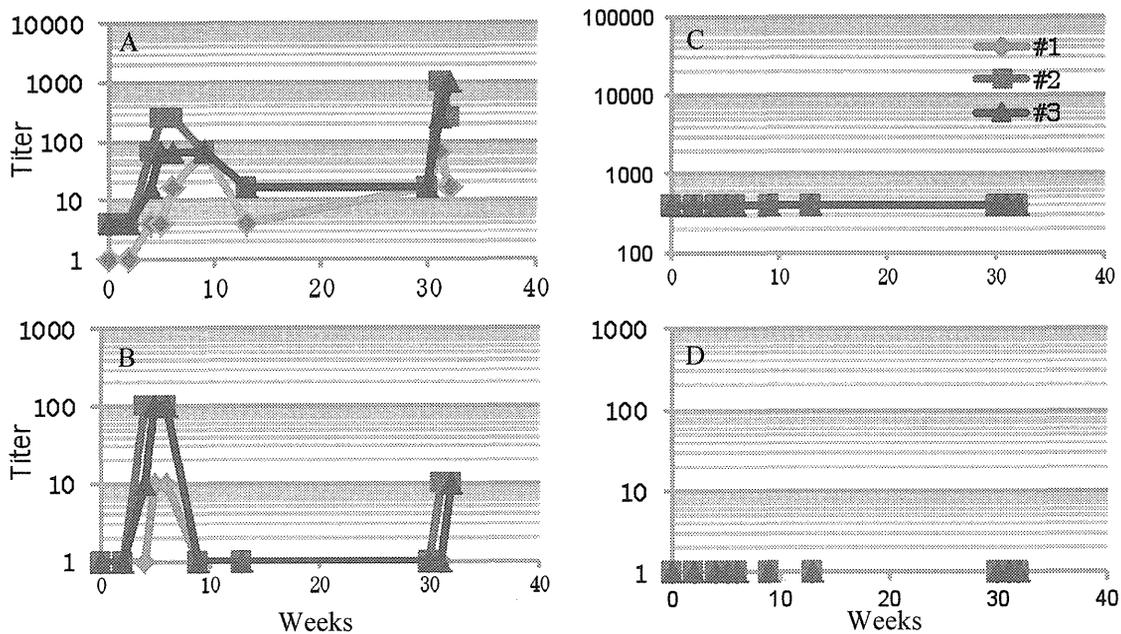


図1. 免疫サルに於ける血中特異抗体価の推移。A:抗 HEV-VLP-IgG 抗体価、B:抗 HEV-VLP-IgA 抗体価、C:抗 Env-IgG 抗体価、D:抗 Env-IgA 抗体価

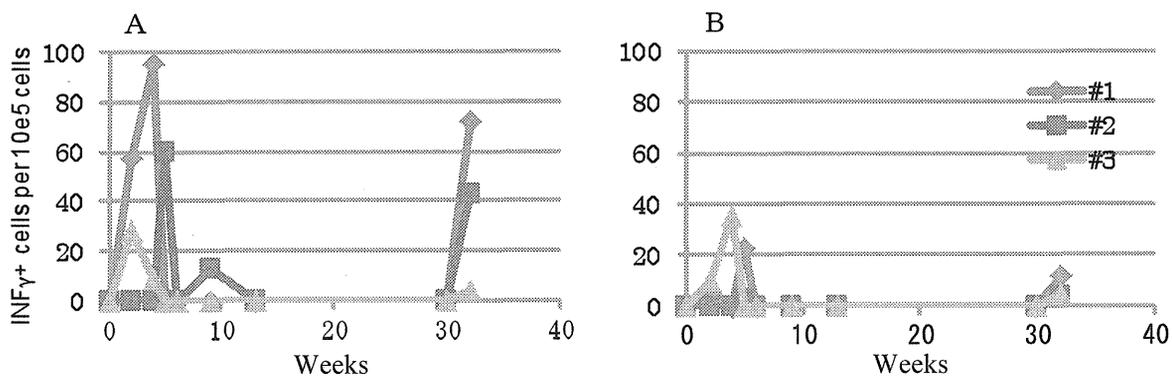


図2. 免疫サルに於ける抹消血リンパ球中の抗原特異的 INF- γ 産生細胞の推移。A:HEV-VLP 特異的 INF- γ 産生細胞、B:Env 特異的 INF- γ 産生細胞

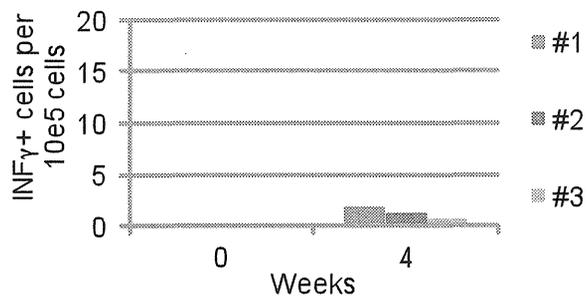


図3. 免疫サルに於ける抹消血リンパ球中の Gag 特異的 INF- γ 産生細胞。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

Gag 抗原発現・分解と機能に関する研究

研究分担者 森川 裕子 北里大学北里生命科学研究所教授

研究要旨

Gag 抗原の分解・抗原提示は HIV 感染防御免疫の誘導に重要である。抗原提示につながる Gag 抗原の分解を理解し、その効率の良い Gag 抗原を設計する目的で、野生型 Gag および Gag 蛋白変異体の分解経路を解析した。サイクロヘキシミドで新規蛋白合成を止めるとともに、プロテアソーム阻害剤（MG-132+ Clasto-lactacystin β -lactone）とリソソーム阻害剤（クロロキン）を用いて蛋白分解を阻害し、残存する Gag 抗原量を経時的に測定した。膜結合能を欠く非ミリスチル化 Gag 蛋白やアセンブリー能を欠く CA 変異体 Gag 蛋白の分解速度や分解経路は野生型 Gag 蛋白とほとんど変わらなかった。一方、MA の膜結合領域の塩基性アミノ酸を置換した Gag 蛋白はエンドソームに局在が変化し、野生型 Gag より効率良くプロテアソーム経路で分解されることが判明した。

A. 研究目的

細胞内で新規合成された endogenous 抗原の一部は、プロテアソームですみやかに分解された後（Nature, 404: 770-774, 2000）、粗面小胞体内で MHC クラス I 分子と結合し、細胞表面に輸送され細胞傷害性 T 細胞に提示される。一方、exogenous 抗原はエンドサイトーシスにより取り込まれて分解された後、エンドソーム内で MHC クラス II 分子に結合し、細胞表面に逆輸送されヘルパー T 細胞に提示される。いずれの経路も、抗原が特定コンパートメントへ輸送され分解されることが必須であり、それらを制御できれば抗原提示効率の上昇が期待できる。

抗原を積極的に MHC 抗原提示経路へ導くいくつかの分子修飾が考案されている。例えば、PEST 配列の付加（Science, 234: 364-368, 1986）や N 末端メチオニンのアミノ酸置換により MHC クラス I 経路への誘導が、クラス II 分子と共局在する LAMP1（Proc Natl Acad Sci USA, 92: 11671-11675, 1995）やインバリアント鎖の付加（Immunol Rev, 172: 87-96, 1999; EMBO J, 27: 1-5, 2008）によりクラス II 経路への誘導が報告されている。分担者は HIV-1 Gag 蛋白をクラス I 経路に誘導する目的で、Gag 蛋白の N 末端開始コドンメチオニンをユビキチン化アルギニンに置換した。また、クラス II 経路に誘導する目的で、Gag 蛋白に LAMP1 を融合させた。これらの分子修飾した Gag 蛋白を HeLa 細胞で発現させ、プロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤を用いて、それぞれの分解経路を調べ

たところ、ユビキチン化アルギニンをアミノ末端にもつ Gag 蛋白はプロテアソーム経路で効率良く分解され、一方、LAMP1 融合 Gag 蛋白はリソソーム経路で分解されることが判明した（H21-23 年度）。これらの分子修飾は Gag 蛋白を抗原提示の特定コンパートメントに効率良く導く方法であると思われた。

こうした分子（ユビキチンや LAMP1）を付加せず、Gag 蛋白を抗原提示の特定コンパートメントに導く方法がないか検討することにした。粗面小胞体（J Virol, 67: 4972-4980, 1993）やエンドソーム（J Virol, 83: 5375-5387, 2009; PLoS Biol, 4: e435, 2006）に局在する Gag 蛋白変異体が報告されていることから、これらの Gag 蛋白変異体の分解経路を解析することとした。

B. 研究方法

(1) DNA 構築

プラスミド：真核細胞発現 pCAGGS プラスミド（Actin プロモーター、スプライシング配列、SV40 ori をもつ）を用いて、HIV-1 pNL43 株 Gag 蛋白を発現させた。Western blotting での検出のためには、Gag 蛋白の C 末端に FLAG 配列を付加した。細胞内局在の解析には、C 末端に EGFP を付加した。

Gag 蛋白変異体：MA の N 末端ミリスチル基付加部位のアミノ酸置換体 Gag (G2A)、MA の N 末端塩基性領域（膜結合領域）のアミノ酸置換体 Gag (K30/32E)、Gag (K26/27/30/32E)、CA の C 末端

側ドメイン二量体形成ヘリックスのアミノ酸置換体 Gag (W184A/M185A) を作製した。

(2) 細胞培養と阻害剤処理

HeLa細胞に上記の Gag-FLAG および Gag-EGFP 発現プラスミドを transfection した。18 hr 後、33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ サイクロヘキシミド (蛋白合成阻害剤) と 10 μM MG-132+10 μM Clasto-lactacystin β -lactone (プロテアソーム阻害剤) あるいは 100 μM クロロキン (リソソーム阻害剤) を添加して培養し、経時的に細胞を回収した。

(3) Gag 抗原の局在

Gag-EGFP 発現細胞を固定した。オルガネラマーカーに対する抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。

(4) Gag 分解の定量

細胞内 Gag 抗原を抗 FLAG 抗体を用いた Western blotting で調べた。Image J でバンドの intensity を測定した。

(倫理面への配慮)

臨床材料を用いた実験を含まないため、生命倫理に対する措置を講じなかった。遺伝子組換え実験については二種省令・二種告示に従った。

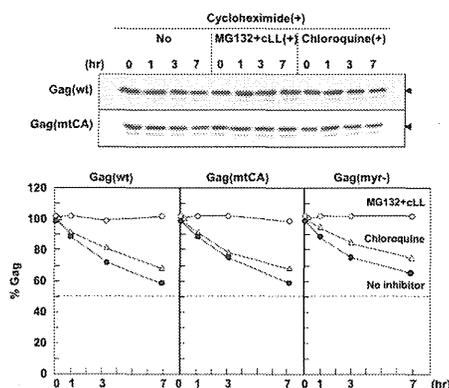
C. 研究結果

(1) 非ミリスチル化 Gag (G2A) 蛋白とアセンブリー欠損 Gag (W184A/M185A) 蛋白の分解

Gag 蛋白 N 末端にミリスチル基が付加されないため膜結合能がない非ミリスチル化 Gag (G2A) 蛋白と、CA の C 末端側ドメイン二量体化部位変異のためアセンブリー能がない Gag (W184A/M185A) 蛋白を、それぞれ FLAG 配列を付加して作製した。コントロールとして FLAG 配列を付加した野生型 Gag 蛋白を用いた。HeLa 細胞で発現させ、蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドを添加して新規合成を止めるとともに、プロテアソーム阻害剤 (MG-132+Clasto-lactacystin β -lactone) あるいはリソソーム阻害剤 (クロロキン) を添加して培養した。経時的に (0, 1, 3, 7 hr) 細胞を回収し、Western blotting で Gag 抗原を検出した後、バンド intensity を Image J で定量した。新規蛋白合成を止めると、野生型 Gag 蛋白の細胞内抗原量は経時的に減少した。その半減期は約 8-9 時間と概算された。非ミリスチル化 Gag (G2A) 蛋白とアセンブリー欠損 Gag (W184A/M185A) 蛋白も新規蛋白合成を止めると

経時的に減少したが、半減期は野生型と差はなかった。いずれも Gag 蛋白の場合も、プロテアソーム阻害剤を処理するとこの減少は見られなくなったが、クロロキン処理では減少をほとんど止められなかった。これらの結果から、野生型および、非ミリスチル化 Gag (G2A) 蛋白とアセンブリー欠損 Gag (W184A/M185A) 蛋白の主な分解経路はプロテアソーム経路であると考えられた (図 1)。

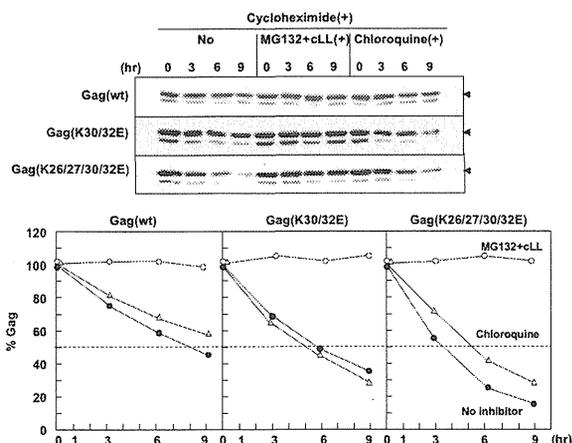
図 1. 非ミリスチル化 Gag 蛋白とアセンブリー欠損 Gag 蛋白の分解



(2) N 末端塩基性領域アミノ酸置換体 Gag (K30/32E および K26/27/30/32E) 蛋白の分解

MA の N 末端は塩基性アミノ酸に富み、細胞膜の酸性脂質と静電的に結合することが知られている。この膜結合領域の 30, 32 位塩基性アミノ酸 K を E に、さらに 26, 27, 30, 32 位塩基性アミノ酸 K を E に置換した Gag (K30/32E) および Gag (K26/27/30/32E) 蛋白を作製した。HeLa 細胞で発現させ、先と同様に、蛋白合成阻害剤サイクロヘキシミドと、プロテアソーム阻害剤 (MG-132+Clasto-lactacystin β -lactone) あるいはリソソーム阻害剤 (クロロキン) を添加し経時的に (0, 3, 6, 9 hr) 細胞を回収した。Western blotting で検出した Gag 抗原を定量したところ、野生型 Gag 蛋白に比べ、Gag (K30/32E) 蛋白はプロテアソーム経路で速く分解された。Gag (K26/27/30/32E) 蛋白のプロテアソーム分解はさらに速かった (図 2)。

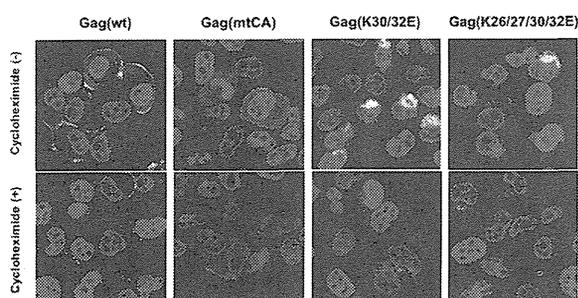
図2. 膜結合領域の塩基性アミノ酸置換体Gag蛋白の分解



(3) Gag 蛋白の細胞内局在

野生型および上述の変異体の C 末端に EGFP を付加した Gag-EGFP を用いて、共焦点顕微鏡で細胞内局在を調べた。サイクロヘキシミド未処理の場合には、野生型 Gag 蛋白は形質膜に粒状に集積して局在した。アセンブリー欠損 Gag (W184A/M185A) 蛋白も主に形質膜に局在するものの、粒状の集積は認められなかった。これらに対し、Gag (K30/32E) および Gag (K26/27/30/32E) 蛋白はもっぱら核周辺領域に粒状に集積し、形質膜への局在は認められなかった。サイクロヘキシミドを添加して新規蛋白合成を止めると、細胞内局在は変化しないものの、EGFP 蛍光のかなりが消失し、Western blotting と相関する結果が得られた。

図3. 野生型および変異体Gag-EGFPの細胞内局在



Gag (K30/32E) および Gag (K26/27/30/32E) 蛋白の細胞内局在を明らかにする目的で、オルガネラマーカー (粗面小胞体として PDI ; トランスゴルジネットワークとして TGN46 ; エンドソームとして CD63 と LAMP1) に対する抗体で免疫染色し、共焦点顕微鏡で観察した。Gag (K30/32E) および Gag (K26/27/30/32E) 蛋白は CD63 や LAMP1 と共

局在したが、PDI や TGN46 とは共局在しなかった。エンドソームに局在することが判明した。従って、これらの Gag 蛋白変異体はエンドソームに局在すると考えられた。

D. 考察

細胞内での HIV-1 Gag 蛋白の半減期は約 6.5 時間と報告されており (J Virol, 82: 9937-9950, 2008)、本研究での野生型 Gag 蛋白の半減期 (8-9 時間) はそれに近似するものであった。プロテアソーム阻害剤とリソソーム阻害剤を用いて調べたところ、野生型 Gag 蛋白の分解は主にプロテアソーム経路であった。しかし、本研究で用いた細胞は transfection 24 hr 前後のものであり、もっと時間が経過した細胞では形質膜に到達した Gag 抗原がエンドサイトーシスされることが報告されていることからリソソーム経路での分解もおこると推測される。

HIV-1 粒子の出芽部位が、MA 領域欠損により粗面小胞体へ (J Virol, 67: 4972-4980, 1993)、また MA 塩基性領域のアミノ酸置換によりエンドソームへ (J Virol, 83: 5375-5387, 2009) 変化すること報告されている。本研究では、これらの Gag 蛋白変異体の分解速度および分解経路を解析した。MA の膜結合領域の塩基性アミノ酸を置換した Gag (K30/32E) および Gag (K26/27/30/32E) 蛋白は、ユビキチン化アルギニンを N 末端に付加した Gag 蛋白 (H21-23 年度の本班研究で作製) よりさらに効率良くプロテアソーム経路で分解されることが判明した (図 2)。MHC クラス I の抗原提示に利用される蛋白質は、合成直後にユビキチン化され、プロテアソーム分解を経て MHC クラス I の抗原提示に有用な候補抗原と思われる。不思議なことに、これらの Gag 変異体蛋白はエンドソームに局在し、プロテアソームに富む粗面小胞体にはほとんど局在しなかった。細胞内局在と分解経路は一見相関しないように思われる。

また、本研究で用いた細胞は HeLa 細胞であり、MHC クラス II 分子の発現を欠く細胞である。マクロファージ系やリンパ球系での検討が必要と思われた。

E. 結論

①MA 膜結合領域の塩基性アミノ酸を置換した Gag 蛋白は、エンドソームに局在し、野生型 Gag より効率良くプロテアソーム経路で分解された。②CA アセンブリー能を欠損した Gag 蛋白や

非ミリストイル化Gag蛋白の分解速度や分解経路は野生型Gag蛋白と変わらなかった。

F. 研究発表

1 論文発表

- (1) Haraguchi H, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa Y. A large extension to HIV-1 Gag, like Pol, has negative impacts on virion assembly. PLOS One 7(10): e47828, 2012.
- (2) Mitsuki Y, Terahara, K, Shibusawa K, Yamamoto T, Tsuchiya T, Ishige, M, Kobayashi K, Morikawa Y, Nakayama T, Takeda M, Yanagi Y, Tsunetsugu-Yokota Y. HIV-1 infection ex vivo accelerates measles virus infection by upregulating signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) in CD4+ T cells. J Virol 86(13): 7227-7234, 2012.
- (3) Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi J-I, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 Gag processing at the plasma membrane through Gag-Pol dimerization. J Virol (in press).

2 学会発表

- (1) Sudo S, Haraguchi H, Hirai Y, Gatanaga H, Sakuragi J-I, Momose F, Morikawa Y. Efavirenz enhances HIV-1 Gag processing on the plasma membrane through GagPol dimerization. CSH Retrovirus Meeting, New York, 5/23/2012.
- (2) 原口日和、森川裕子. 生細胞分子イメージン

グによる HIV-1 Gag/GagPol 蛋白の細胞内動態解析. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.

- (3) 池野翔太、寺原和孝、石毛真行、鈴木基臣、光木裕也、森川裕子、中山哲夫、横田恭子. ヒト化マウスの麻疹ウイルスベクター評価系への応用. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.
- (4) 百瀬文隆、森川裕子. インフルエンザウイルス vRNP 陽性リサイクリングエンドソームの極性輸送に関する宿主因子の機能解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.
- (5) 大倉喬、齋藤桃子、百瀬文隆、森川裕子. インフルエンザウイルス膜タンパク質の協調的極性輸送機構の解析. 第60回日本ウイルス学会学術集会、大阪、11/13/2012.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1 特許取得

なし。

2 実用新案登録

なし。

3 その他

なし

Vif 抗原発現・分解と機能に関する研究

研究分担者 高折 晃史 京都大学医学研究科 教授

研究要旨 我々は HIV-1 Vif が誘導する細胞周期 G2 期停止が TP53 依存性であることおよび感染を促進することをすでに報告しているが、今回 Vif が TP53 のセリン 15、20、37、46 をリン酸化することを見出した。さらにセリン 15 のリン酸化が細胞周期停止やウイルス感染増強に必須であることを証明した。

A. 研究目的

我々は HIV-1 Vif が誘導する細胞周期 G2 期停止が TP53 依存性であることおよび感染を促進することを報告したが (Izumi ら、PNAS 2010)、その詳細なメカニズムは依然不明である。そこで、本研究では TP53 のリン酸化について検討した。

B. 研究方法

Vif 遺伝子を細胞に導入し、抗リン酸化セリン TP53 特異抗体を用いたイムノブロット法により TP53 のリン酸化を検討した。さらに、これらのセリン残基をアラニンに置換した変異体を作成し、細胞に一過性あるいは恒常的に導入し、細胞周期の検討やウイルス感染実験を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、組み換え DNA や病原体を用いるため、拡散の防止や種の多様性に関する配慮が必要であり、「組み換えヒト免疫不全ウイルスを用いたエイズ発症機構の解明と抗 HIV-1 宿主因子 APOBEC3 ファミリー蛋白によるウイルスの感染制御機構に関する研究」として第二種使用等拡散防止処置確認申請を行い、平成 23 年 2 月 10 日付けで承認済である。

C. 研究結果

Vif は TP53 の Ser¹⁵、Ser²⁰、Ser³⁷ および Ser⁴⁶ のリン酸化を増強することを見出した。さらに、これらのセリン残基をアラニンに置換した変異体の解析により、Ser¹⁵ のリン酸化が Vif の誘導する G2 停止やウイルス感染の増強に必須であることを示した (投稿中)。

D. 考察

Vif の誘導する G2 停止やウイルス感染の増強に関して、そのメカニズムの一端を明らかにした。

この結果は Vif に未知の細胞内標的因子があることも示唆しており、今後の更なる研究の成果が期待できる。

E. 結論

HIV-1 Vif が感染性を増強するメカニズムの一部を明らかにした。

F. 研究発表

1. 論文発表

Shinohara M, Io K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Scientific Reports* 2, 806.

Fujita H, Kitawaki T, Sato T, Maeda T, Kamihira S, Takaori-Kondo A, and Kadowaki N. The tyrosine kinase inhibitor dasatinib suppresses cytokine production by plasmacytoid dendritic cells by targeting endosomal transport of CpG DNA. *European Journal of Immunology* 43:93-103, 2012.

Furukawa A, Okamura H, Morishita R, Matsunaga S, Kobayashi N, Ikegami T, Kodaki T, Takaori-Kondo A, Ryo A, Nagata T, Katahira M. NMR study of xenotropic murine leukemia virus-related virus protease in a complex with amprenavir. *Biochem Biophys Res Commun* 425(2):284-9, 2012.

Matsunaga S, Sawasaki T, Ode H, Morishita R, Furukawa A, Sakuma R, Sugiura W, Sato H, Katahira M, Takaori-Kondo A, Yamamoto N, Ryo A. Molecular and enzymatic characterization of XMRV protease by a cell-free proteolytic analysis. *J Proteomics* 75(15):4863-73, 2012.

Chonabayashi K, Hishizawa M, Kawamata S, Nagai Y, Ohno T, Ishikawa T, Uchiyama T, and

Takaori-Kondo A. Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. *Leukemia*, in press.

2. 学会発表

Io K, Matsui Y, Shindo K, Izumi T, Matsui M, Shinohara M, Takaori-Kondo A. HIV-1 Vif induces serine phosphorylation of p53 likely through proteasomal degradation of cellular targets. Cold Spring Harbor Meeting on Retroviruses 2012
松井佑亮、新堂啓祐、永田佳代子、永井雄也、

井尾克宏、篠原正信、多田浩平、阪本貴士、小林正行、高折晃史 BiFC 法(蛍光蛋白再構成法)による HIV-1 Vif と CBF β の相互作用解析
第 26 回日本エイズ学会

井尾克宏、新堂啓祐、泉 泰輔、西澤正俊、松井道志、篠原正信、阪本貴士、多田浩平、松井佑亮、丸山 亙、小林正行、高折晃史 Vif は p53 のリン酸化を介して HIV-1 の感染性を増強する
第 26 回日本エイズ学会

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）
該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）

分担研究報告書

HIV持続感染成立機構とその防御機序に関する研究

研究分担課題名: Env抗原及び抗体に関する研究

研究分担者 吉村 和久 国立感染症研エイズ研究センター 室長

研究要旨:

われわれは、これまで *in vitro* の薬剤及び中和抗体逃避ウイルス誘導を、様々な臨床分離ウイルスを用いて行って来た。特に、CCR5 inhibitor[maraviroc (MVC)]からの逃避ウイルスが anti-Env 中和抗体に感受性になる一群の変異を同定してきた。そこで *in vitro* で誘導した低 CCR5 発現細胞への馴化ウイルスと MVC 高度耐性ウイルスの Env 組換えウイルスを作製し、詳細に gp120 の変異と中和抗体の感受性の関連性を調べた。その結果、耐性付与前は多くの中和抗体に抵抗性であったウイルスが、高度 MVC 耐性変異付与後は、ほとんどの中和抗体に対して高度感受性へと変化した。また、ウイルスを樹立した症例の血清 IgG を精製し、中和感受性を調べたところ、高度 MVC 耐性変異 Env ウイルスは、それまで完全耐性だった血清 IgG に対して、高度感受性へと劇的に変化していた。シークエンスの結果、新たに獲得された Env の耐性変異部位、V200I, T297I, M434I, K305R が抗体感受性に深く関わっている可能性が強いと予想された。今年度でそれぞれの変異を順番に野生株に戻した組み換えウイルスと、単独で持っているウイルスの作製が終了したため、来年度以降は中和抗体感受性の異なる感染性クローンパネルの構築を推進する。

A. 研究目的

AIDS ワクチン開発を阻む最も大きな問題点は、細胞性にしろ液性免疫にしろ、決定的なワクチン抗原が見つからない事に尽きる。特に、液性免疫は Env の多様性により、同一サブタイプウイルス株に有効な抗原の開発すら困難を極めている。我々の研究室では、これまで *in vitro* の薬剤及び中和抗体逃避ウイルス誘導を、様々な臨床分離ウイルスを用いて行って来た。特に、entry inhibitor からの逃避ウイルスが anti-Env 中和抗体に感受性になる一群の変異を複数同定している。そこで Env の立体構造と抗体の感受性の関係を、独自に構築した感染ウイルスクローンパネルを用いて詳細に検討していくことで、抗体誘導ワクチンの抗原選択に新たな道筋を付けていく事を目的とする。

B. 研究方法(倫理面への配慮)

CCR5 高発現 T 細胞株である PM1/CCR5 細胞と親細胞株である PM1 細胞 (CCR5 発現量が PM1/CCR5 細胞に比較して非常に低い) を用い、*in vitro* R5 ウイルスの CCR5 阻害剤 (maraviroc; MVC) に対する耐性誘導を行い、得られたそれぞれの継代ウイルスを用いて、これらのウイルスの envelope のシークエンスを行い、耐性能付与責任変異部位を特定する。また、MVC 耐性変異を持つウイルスの Env を pNL43 ベースの plasmid に組み込み、感染性クローンウイルスを作製する。それをもとに、site-directed mutagenesis 法を用いて、耐性変異部位と予測されるアミノ酸部位を一つずつ組み込んだクローンを作成し、中和抗体感受性の異なる感染性クローンパネルを構築する。

(倫理面への配慮)

本研究のウイルス分離に関しての倫理的・科学的妥当性は熊本大学附属病院の先進医療審査委員会で審査され、了承されている。また、遺伝子組み換え生物等を用いる実験については、必要に応じた国立感染症研究所の機関承認を取得済みである。

C. 研究結果

実験に使用している R5 臨床分離株は、血友病症例から得たサブタイプ B 株 (熊本大学エイズ学研究センター松下修三教授よりご供与) である。*in vitro* 耐性誘導は、ウイルス継代中の細胞上清中の MVC の濃度を 1 nM から開始し、徐々に薬剤濃度を上げて行き、最終的には 10 μ M まで上げるという方法で行った (48 パッセージ)。次に、それぞれのパッセージウイルスの Env シークエンスを行い、比較検討した。その結果、MVC 耐性誘導ウイルスと PM1 細胞への低 CCR5 馴化ウイルスの違いは、MVC 耐性ウイルスの C2, V3 及び C4 領域に新たに認められた、V200I, T297I, M434I の耐性変異であった。最終パッセージ近くの 41 パッセージ以降は V3 (K305R) に新しい変異が確認され、それとともにウイルス抑制試験における最大抑制濃度のプラトーの位置が低下した。

このようにして樹立された、低 CCR5 発現細胞への馴化ウイルスと MVC 高度耐性ウイルス、およびコントロールウイルスの Env を pNL43 ベースの plasmid に組み込み、それぞれの感染性クローンウイルスを作製した (図 1)。これらの組換えウイルスを用いて、gp120 の変異と中和抗体感受性との関連性を調べた結果、高度

MVC 耐性変異 Env を持つウイルスは、低 CCR5 馴化 Env を持つウイルスよりも CD4bs と CD4i 抗体に対してより感受性になっただけでなく、抗 V3 中和抗体に対しても高度感受性へと変化することが分かった。

次に、このウイルスを分離した症例から治療開始後 1-3 ヶ月ごとに定期的に採血（7 ポイント）し、血清から IgG を精製した。精製した血清 IgG に対する中和感受性を Env 組換えウイルスを用いて調べた結果、驚くべき事に MVC 耐性ウイルスはそれまで全く中和されなかった自己の血清 IgG 抗体に対して全てのポイントで高度中和感受性を示した（図 2）。これらの事実から、新たに獲得された Env の耐性変異アミノ酸部位、V200I, T297I, M434I, K305R が抗体感受性に深く関わっている可能性が強いと予想された。そこで、それぞれの変異を順番に抜いていった組み換えウイルスと、単独で持っているウイルスの作製を試み、ほぼ終了した（図 1、3）。来年度以降は、これらのウイルスパネルを用いて、感染症例から得た血清中に含まれる中和抗体の種類が同定可能かどうかを検討していく。

D. 考察

今回、中和抗体への感受性が著しく変化した低 CCR5 発現細胞への馴化ウイルス、MVC 高度耐性ウイルスの Env を pNL43 ベースの plasmid に組み込み、感染性クローンウイルスを作製し、種々の抗体に対するアッセイを行った。その結果、MVC に高度耐性を付与する Env の変異が Env 全体の 3 量体での立体構造を変化させて、特に V3 に対する中和抗体のアクセスを良くすることが示唆された。また、MVC に高度耐性を付与する Env の変異は、自己の血清 IgG に対する感受性も劇的に回復させる事も分かった。このことは、特定部位の Env の変異が抗体の中和感受性を劇的に変化させる事を示している。

これまで、感染者の血清中の抗体の種類は特定抗原領域に対する結合性や、V3 ペプチドや sCD4 との拮抗阻害などを、ELISA や FACS 等非常に煩雑な方法で決定する必要があった。しかし、われわれの構築しているウイルスパネルが実用化できれば、ウイルスの感受性を調べるだけで、およその抗体の種類と力価が推定可能となる。

来年度は、現在作製中の抗体感受性の異なる感染性クローンウイルスパネルを完成させる事を目指す。そして、このパネルにより、感染症例から得た血清中に含まれる中和抗体の種類が同定可能かどうかを検討する予定である。

E. 結論

中等度~高度 MVC 耐性変異 Env をもつ組換えウイルスを作製し、抗体に対する中和感受性の異なるウイルスパネルの構築を行った。このパネルを用いて、簡便に感染者血清に含まれる中和抗体の種類と力価を知る事が可能となれば、薬剤の組み合わせだけでなく、ウイルスシークエンスと中和抗体産生の関係を知る事が出来、ワクチン抗原の検索に有用な知見を得られるといえる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表 (*corresponding author)

1. Harada S, Yoshimura K*, Yamaguchi A, Boonchawalit S, Yusa K, and Matsushita S. Impact of antiretroviral pressure on selection of primary HIV-1 envelope sequences in vitro. J Gen Virol, in press.
2. Ong YT, Kirby KA, Hachiya A, Chiang LA, Marchand B, Yoshimura K, Murakami T, Singh K, Matsushita S, Sarafianos SG. Preparation of biologically active single-chain variable antibody fragments that target the HIV-1 gp120 V3 loop. Cell Mol Biol, 2012, 58:71-9.
3. Yokoyama M, Naganawa S, Yoshimura K, Matsushita S, Sato H. Structural Dynamics of HIV-1 Envelope Gp120 Outer Domain with V3 Loop. PLoS ONE, 2012, 7: e37530.

学会発表

(国際学会)

1. Yoshimura K, Harada S, Boonchawalit S, and Matsushita S. Impact of Maraviroc-resistant and low CCR5-adapted mutations induced in vitro passage on sensitivity to anti-Env neutralizing antibodies. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
2. Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues bind at three amino acid positions in the gp120 CD4 cavity. 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2013), Atlanta, U.S.A., 3.3-6, 2013.
3. Harada S, Boonchawalit S, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of twelve CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 13th Kumamoto AIDS Seminar GCOE Joint International Symposium, Kumamoto, Japan, Oct.24-26, 2012.

4. Harada S, Arai H, Narumi T, Tamamura H, Matsushita S, Yoshimura K. In vitro induction of ten CD4 mimic small compounds, NBD-556 and its analogues, resistant variants using primary R5 HIV-1. 19th International AIDS Conference, Washington, D.C., U.S.A., 7.22-28, 2012.
- (国内学会)
1. 原田 恵嘉、鳴海 哲夫、玉村 啓和、松下 修三、吉村 和久. R5 臨床分離株を用いた CD4 類似低分子化合物誘導体に対する in vitro 耐性ウイルス誘導. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日 [035-165]
 2. 桑田 岳夫、吉村 和久.、松下 修三. SIV 感染サルから分離された中和抗体B404はV3, V4ループを含むEnv立体構造を認識する。第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日 [013-062]
3. 廣田 雄樹、鳴海 哲夫、橋本 智恵、吉村 和久.、原田 恵嘉、大附 寛幸、三浦 智行、五十嵐 樹彦、相川 春夫、野村 渉、松下 修三、玉村 啓和. HIV外被タンパク質gp120を標的とするインドール型低分子CD4ミミックの創製研究. 第26回日本エイズ学会学術集会・総会、神奈川、2012年11月24日-11月26日 [WS2-007]
 4. 原田 恵嘉、新井 啓之、鳴海 哲夫、玉村 啓和、松下 修三、吉村 和久. R5 臨床分離株を用いた10種のCD4類似低分子化合物に対するin vitro 耐性ウイルス誘導. 第14回白馬シンポジウム, 2012. 6. 7-8, 京都.
 5. 吉村 和久. CCR5阻害剤による耐性変異と中和抗体感受性. 第14回白馬シンポジウム, 2012. 6. 7-8, 京都.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

図 1. 中和抗体感受性の異なるウイルス Env を持つ感染性クローンプラスミドの作製

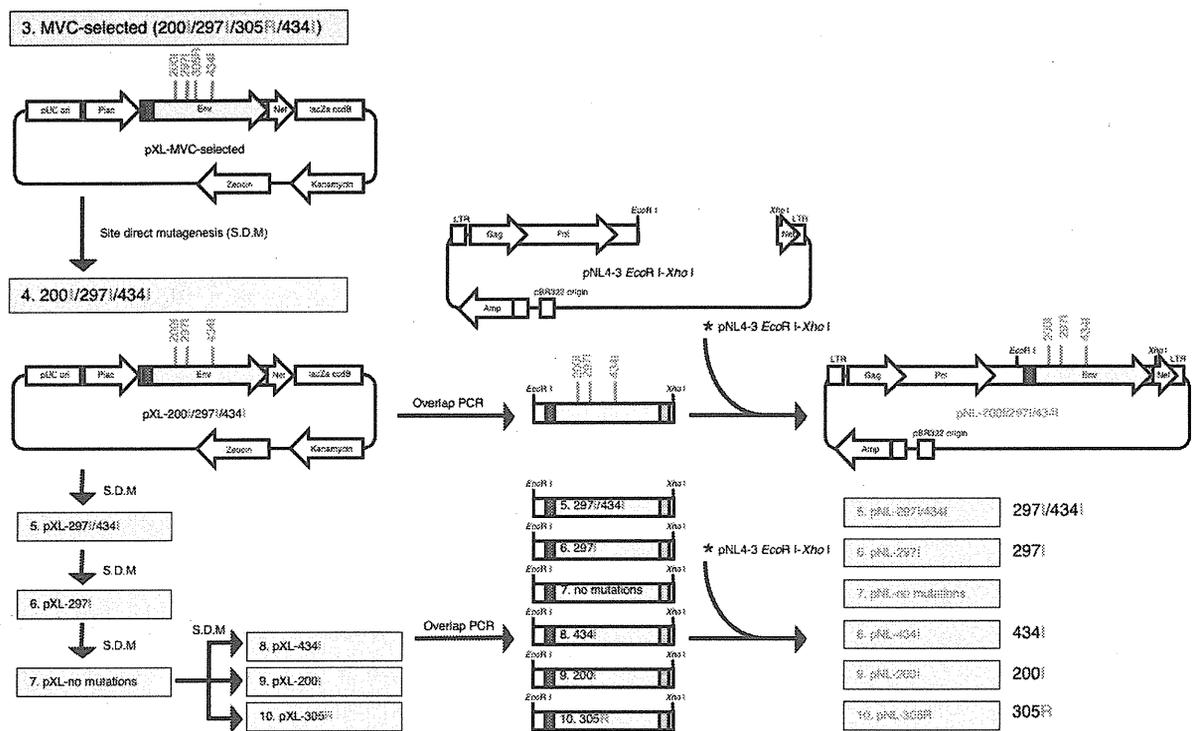


図 2. 変異 Env を持つ感染性クローンウイルスの患者血清 IgG (Y1-IgG1~7) に対する感受性の比較

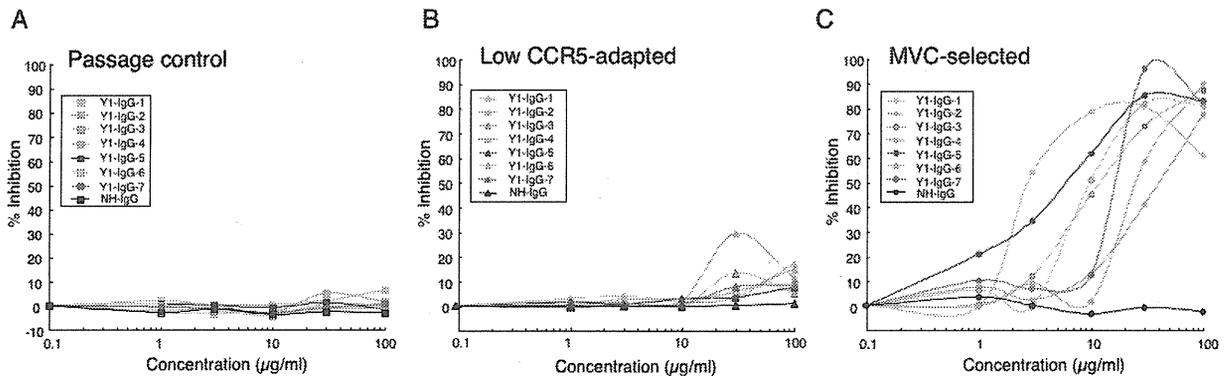


図 3. 中和感受性の異なる Env を持つ感染性クローンウイルスの変異導入部位の比較

	C1		V1			V2	C2		V3			C3	V4	C4		V5		
	65	84	137	141	148	187	200	297	305	309	317	321	333	402	434	436	463	
1 pNL-Passage control	48p	V	V	E	D	K	D	V	T	K	M	F	E	I	-	M	A	I
2 pNL-Low CCR5 adapted	48p	V	I	E	N	K	D	V	T	K	M	W	D	I	-	M	T	T
3 pNL-MVC selected (200/297/305R/434)	48p	K	V	K	N	Q	G	I	I	R	I	L	D	L	T	I	A	T
4 pNL-MVC selected (200/297/434)	34p	K	V	K	N	Q	G	I	I	K	I	L	D	L	T	I	A	T
5 pNL-MVC selected (297/434)	21p	K	V	K	N	Q	G	V	I	K	I	L	D	L	T	I	A	T
6 pNL-MVC selected (297)	17p	K	V	K	N	Q	G	V	I	K	I	L	D	L	T	M	A	T
7 pNL-MVC selected (no mutations)	14p	K	V	K	N	Q	G	V	T	K	I	L	D	L	T	M	A	T
8 pNL-MVC selected (434)		K	V	K	N	Q	G	V	T	K	I	L	D	L	T	I	A	T
9 pNL-MVC selected (200)		K	V	K	N	Q	G	I	T	K	I	L	D	L	T	M	A	T
10 pNL-MVC selected (305R)		K	V	K	N	Q	G	V	T	R	I	L	D	L	T	M	A	T

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
分担研究報告書

HIV 抗原の機能維持に必要な構造に関する研究

研究分担者 横山 勝 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官

研究要旨

HIV-1 gp120 の機能構造を知るため、gp120 全長単量体モデルの分子動力学計算を行い、動的性質を調べた。gp120 全長単量体モデルの動的性質は、V1/V2 領域、V3 領域、 $\beta 20/\beta 21$ ループなどの運動が関連していることを示唆していた。この運動の相関から、gp120 全長単量体モデルは受容体結合後の構造変化も説明できる機能構造を表していると考えられる。gp120 全長単量体モデルを用いて三量体モデルを構築すると、V3 先端が三量体の中心に向かって配置され、抗 V3 抗体が結合できないことが示唆された。

A. 研究目的

HIV-1 エンベロープ蛋白質は感染受容体との結合部位を持つ gp120 と、ウイルスと標的細胞との膜融合に重要な gp41 からなり、gp120 と gp41 のヘテロダイマーが三量体を形成している。gp120 の V3 領域は感染受容体との相互作用に中心的役割を担う。そのため本来は、機能的制約が強く作用し、アミノ酸変異は抑制されるはずである。ところが V3 は高変異領域として知られる。これは、V3 は免疫原性が高く、持続感染には抗原変異を必要とするためと考えられている。HIV の主要中和領域は V3 領域に位置する。しかしながら、V3 領域や gp120 の他の領域を認識する抗体は、gp120 単量体では中和感受性であるが、多量体となると低感受性であるものが多い。

本研究は、抗原の機能維持に必要な構造を知ることで、ウイルス蛋白質の脆弱部位を特定し、抗体の中和能を人為的に高める方法を開発することを目的とする。成果をワクチン開発に還元することを目指す。

今年度は HIV-1 gp120 の機能構造を知るため、gp120 全長単量体モデルの分子動力学計算を行い、動的性質を調べた。

B. 研究方法

(1) HIV-1 gp120 全長分子モデルの構築

これまでに HIV-1 gp120 の構造は X 線結晶構造解析や NMR を用いて、部分構造でのみ決定されている。X 線結晶構造解析では構造を安定化するために、抗体などとの複合体としている。そのため、

決定されている構造は抗体などの影響を受けていると考えられる。本研究では、抗体などの影響を軽減した全長構造を得るために、ホモロジーモデリング法と分子動力学計算を組み合わせることにより、HIV-1 gp120 全長分子モデルを構築した。ホモロジーモデリング法では、ターゲット配列として中和抵抗性株である JR-FL のアミノ酸配列を用いた。全長構造の gp120 分子モデルを構築するため、複数の構造を鋳型として用いた。使用した鋳型は gp120 コア (PDB code: 3JWD)、V1/V2 stem (PDB code: 3IDX)、V1/V2 (PDB code: 3U4E)、V3 (PDB code: 2QAD)、V4 (PDB code: 2B4C)、C5 (PDB code: 1MEQ) である。糖鎖は Glycoprotein Builder (<http://glycam.ccruc.uga.edu/ccrc/gp/>) を用いて、High mannose 型である $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ を付加した。得られた gp120 分子モデルを初期構造に用いて、分子動力学計算により平衡構造を得た。分子動力学計算には Amber10 の pmemd モジュール、力場は蛋白質には ff99SB-ILDN、糖鎖には Glycam06 を用いた。圧力は 1 atm、温度は 310 K、塩濃度は 150 mM NaCl、シミュレーション時間は 50 ns とした。

(2) HIV-1 gp120 全長三量体分子モデルの構築

HIV-1 gp120 全長三量体分子モデルは、ホモロジーモデリング法と分子動力学計算を組み合わせることにより得た HIV-1 gp120 全長分子モデルを、クライオ電子顕微鏡法により得られた構造 (PDB code: 3DNN) に重ね合わせることで構築した。

(3) 解析

分子動力学計算により得られたトラジェクトリーを用いて、AmberTools の ptraj モジュールに