

サル免疫不全ウイルス・カプシド蛋白の  
分子間 N-C ドメインの機能的相互作用に  
重要なアミノ酸配列に関する研究

稲垣 奈都子

# 目次

要旨	4
第1章 序章	5
第2章 材料と方法	13
2.1 変異ウイルスの作製	13
2.2 ウイルス複製能の検討	15
2.3 SIVmac239Gag205E 変異体の継代実験	15
2.4 Viral competition assay	17
2.5 構造シミュレーション解析	18
2.6 前期過程の検討	20
2.7 後期過程の検討	20
2.8 In vitro stability assay	21
2.9 MHC ハプロタイプ 90-120-Ia を有する SIVmac239 感染 サル慢性期の解析	23

<b>第3章 結果</b>	<b>25</b>
3.1 野生型および SIVmac239Gag205E 変異体の複製能の比較	25
3.2 SIVmac239Gag205E 変異体の継代実験	26
3.3 GagV340M 変異の SIVmac239Gag205E 変異体複製能に 及ぼす影響	27
3.4 Competition assay による複製能の解析	28
3.5 CA タンパク質構造シミュレーション解析からみた Gag205 と Gag340 の関係	30
3.6 ウイルスライフサイクル前期および後期過程の スクリーニング	32
3.7 In vitro におけるウイルスコアの安定性の検討	33
3.8 MHC ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性サルの SIVmac239 野生型感染慢性期における解析	35
<b>第4章 考察</b>	<b>37</b>
<b>第5章 参考文献</b>	<b>43</b>

第6章 図表 56

第7章 謝辞 74

## 論文の内容の要旨

論文題目 サル免疫不全ウイルス・カプシド蛋白の分子間 N-C ドメインの機能的相互作用に重要なアミノ酸配列に関する研究

指導教員 俣野 哲朗教授  
東京大学大学院医学系研究科  
平成 19 年 4 月入学  
医学博士課程  
病因・病理学専攻  
稲垣 奈都子

多様性の高いゲノムを有するエイズウイルスの中で比較的保存性が高いゲノム領域にコードされる Gag カプシドタンパク (CA) の構造上の制約を知ることは、ワクチン抗原デザインや抗 HIV 薬開発に有用である。私は細胞傷害性 T リンパ球の認識に影響する CA の 1 アミノ酸置換を有する変異体の解析を行い、CA の N 末端ドメイン内のある 1 アミノ酸と C 末端ドメイン内の 1 アミノ酸の相互作用がウイルス複製に重要であることを *in vitro* および *in vivo* の両視点から明らかにした。本研究は、CA ドメイン間の機能的相互作用のための構造上の制約を提示するものである。

# 1 序章

---

今日、重篤な免疫系疾患である後天性免疫不全症候群（acquired immunodeficiency syndrome、AIDS）は世界的に主要な死亡原因の一つである。AIDSの原因であるヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus、HIV）およびサル免疫不全ウイルス（simian immunodeficiency virus、SIV）は、一本鎖 RNA をゲノムに持つレトロウイルス科レンチウイルス属に分類される。HIV/SIV はヘルパーTリンパ球やマクロファージなどのCD4陽性細胞への吸着・侵入に始まり、脱殻、RNA ゲノムのウイルス逆転写、核移行、宿主染色体への組み込み、転写、翻訳、アセンブル、出芽、成熟を一連の機序として複製を行う（図1）。吸着・侵入から染色体の組み込みまでのプロセスを前期過程、それ以降のプロセスを後期過程と大別する。ウイルス遺伝子宿主体内においてウイルスが複製を繰り返す一方で、適応免疫反応が誘導される。しかし自然感染ではウイルスを完全に排除することが出来ず、慢性感染症を引き起こし宿主適応免疫系の中心的存在であるヘルパーTリンパ球の枯渇と日和見感染の発症を特徴とするエイズ発症に至る。

1981年に初めてAIDS症例が報告され、現在までにHIV陽性者の発症阻止のために数多くの抗レトロウイルス薬が開発され多剤併用療法（highly active antiretroviral therapy、HAART）によりウイルスの増殖を防御することが可能とな

った。しかしながら、HAART に伴う問題も無視できない。長期服用による副作用や薬剤耐性株の出現によるウイルスの完全排除不能という点もさることながら、何よりも高額な医療費および医療体制の不整備が大きな問題となっている。このため効果的な AIDS 予防ワクチン、AIDS 治療ワクチンそして新薬を開発することが、急務とされる。この非常に大きな課題の克服には、HIV/SIV の生物学的性質、HIV/SIV と感染細胞の相互作用そして免疫系の応答について、今以上に解明を進めることが求められている。

HIV/SIV ゲノムには、レトロウイルスで最多の 9 種類の遺伝子が存在する (図 2)。その遺伝子産物として構造タンパク質の Gag、Pol、Env、調節タンパク質の Tat、Rev、そしてアクセサリタンパク質の Vif、Vpr、Vpu (HIV-1)、Vpx (HIV-2、SIVmac、SIVsmE)、Nef がある。Pol は Gag-Pol 前駆体として合成され、ウイルス複製の出芽以降の段階で自身のもつプロテアーゼによりプロセッシングを受け、プロテアーゼ (PR)、逆転写酵素 (RT)、インテグラーゼ (IN) となり、酵素活性を担う。Gag は Gag 前駆体として合成され、Pol 同様複製の最終段階でプロテアーゼによりプロセッシングを受け、マトリックス (MA)、カプシド (CA)、ヌクレオカプシド (NC)、p6 となる。これらは、ウイルス粒子の主要構成タンパク質として重要な役割を担っている。

HIV/SIV は、宿主免疫応答から逃れる手段として高頻度高確率で変異が入るた

め、多様性に富んでいる (1-3)。この多様性に富んだゲノムを有する HIV/SIV において、構造上 N 末端ドメイン (NTD) と C 末端ドメイン (CTD) から構成される CA は比較的保存性が高いことが知られている (4-6)。CA は、ウイルス粒子形成、出芽、脱殻、逆転写といった多くのプロセスに関与しており、ゲノム保存性の高い CA タンパク質の構造上の制約を知ることは、ワクチン抗原デザインや抗 HIV 薬開発に有用であると考えられる。

HIV は性交渉、出産・授乳、注射針の使いまわしなどにより人から人へ伝播する。その中で特に問題の一つとなっている性交渉による感染の場合、生殖器や腸管粘膜が主な伝播経路である。HIV がこの最初のバリアである粘膜上皮の通過においては上皮の損傷部位を介する機序が考えられているが、さらに損傷がない場合でも上皮や M 細胞のトランスサイトーシスにより侵入することができると考えられている。経粘膜感染が成立した HIV は CCR5 指向性ウイルスと考えられており、レセプターとして CD4 とケモカインレセプター CCR5 を利用する。粘膜固有層・粘膜下組織で CCR5 陽性樹状細胞やマクロファージ、CD4 陽性 T 細胞に感染し、更に全身へ伝播して複製・増殖を行う。

腸管粘膜はいくつもの防御機構が張り廻らされていると考えられており、パイエル板や他の腸管関連リンパ組織からなる免疫誘導組織で誘導された IgA 前駆 B 細胞が最前線を防御する。その下位の粘膜固有層と上皮間は実効組織として機能

し、免疫誘導組織から記憶細胞に分化したリンパ球が供給されている。続いての防御機構は粘膜固有層であり CCR5 エフェクター記憶 T 細胞に富む。ウイルス特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) は主要組織適合性遺伝子複合体 (major histocompatibility complex) クラス I (MHC-I) を介して感染細胞を殺傷している。CD4 陽性 T 細胞もヘルパーとして B 細胞の活性化、中和抗体産生や CTL の活性化に貢献する一方で HIV のターゲットともなり喪失することが問題だと考えられている。

CTL は、HIV/SIV の複製抑制に中心的役割を担う宿主適応免疫系の代表的エフェクターである (7-12)。HIV-1 感染症の解析で感染初期のウイルス特異的 CTL レベルと血中ウイルス量との間に逆相関関係を認めたこと (7-9)、更にサルエイズモデルにおける抗 CD8 抗体投与実験で CTL の枯渇に伴いウイルス量が増加を示したこと (10-12) などから HIV 感染防御における CTL の重要性が示された。

CTL は、ウイルス感染細胞膜表面に発現している各個体固有の MHC-I 分子に結合した抗原エピトープを特異的に認識し、感染細胞に対しグランザイムやパーフォリンなどを注入して細胞傷害を起こす。しかしながら、ウイルスの中にはこのような CTL の強い HIV 複製抑制作用の下で変異を獲得し CTL からの認識から逃れる場合がある (13-16)。この変異は CTL エスケープ変異と呼び、エピトープ内ないしエピトープ近傍に変異が入ることにより抗原提示不全となり、その結果

CTL の認識機構から逃避可能となる。あるいは抗原提示はされても変異により CTL の TCR 認識から逃れることが出来、細胞傷害を免れることもある。例えば、調節タンパク質 Tat のような HIV タンパク質では、エスケープ変異が生じてもウイルス複製能の低下につながらないことが多い。一方 Gag のような構造が比較的保存されているような HIV タンパク質では、CTL エスケープ変異によりウイルス複製能が低下する場合が多々認められる (3,17-23)。このような変異ウイルスが体内で増殖するためにはウイルス複製能の低下を補うような代償性変異を必要とするケースがいくつか報告されている。

HIV 慢性持続感染成立機序および AIDS 発症機構の解明には動物モデルにおける解析が重要である。しかしながら、HIV 感染で AIDS 発症に至る理想的な動物モデルは存在しなく、SIV 感染サルエイズモデルが最適とされている。SIV の代表株である SIVmac は CCR5 指向性であり CD4 陽性メモリーT リンパ球に優位に感染し、エイズ発症までに数年を要す。HIV-1 と SIVmac では HIV-1 にある Vpu タンパク質は SIVmac には存在せず代わりに Vpx タンパク質が存在するなど両者間の アミノ酸配相同配列は 50 % 前後ではあるが、ウイルスの細胞レベルでの複製については多くの共通した機序が知られており、SIV 研究で得られた情報が HIV 研究に反映できる場合が多い。更に病態進行についても共通点が多い。SIVmac はアカゲザルなどに感染すると、一過性の急激なウイルス増殖後セットが

イント期を経て慢性感染症に移行し AIDS を発症する。例えば、HIV-1 に対する CTL 反応の有効性から MHC-I の遺伝子多型が HIV-1 感染後のウイルス量や予後に影響する事が報告されており (24)、サルモデルにおいても認められている。また HIV-1 感染急性期に腸管粘膜のメモリーCD4 陽性 T リンパ球が大量に破壊されることが報告されており (25-29)、サルモデルでも同様である。このようにサル SIV 感染症とヒト HIV 感染症とでは相違点もあるが慢性持続感染へと移行する感染動態について共通する点も多く、病態解析や長期的なウイルス制御を目的とする抗ウイルス薬やワクチン開発において大変有効な動物モデルと考えられている。

私が所属する研究室では、DNA プライム・Gag 発現組換えセンダイウイルスベクターブースト法による CTL 誘導型予防エイズワクチンを開発し、MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性ビルマ産アカゲザル群で、ワクチン誘導 CTL が SIVmac239 野生型 (30) の複製を感染初期および感染慢性期にわたり制御可能なことを初めて明らかにした (19,31)。これら複製制御群において、Gag<sub>206-216</sub> (IINEEAADWDL) エピトープ特異的 CTL 反応が重要な役割を担っており、この CTL からのエスケープ変異 GagL216S (Gag の 216 番アミノ酸ロイシン (L) がセリン (S) に置換) をもつウイルスが感染初期に急速に選択されていた。GagL216S 変異を有するウイルスは野生型ウイルスと比較して複製能が低下しており、複製能と引き換えの CTL エスケープ変異と考えられた (32)。

この MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性アカゲサルワクチン接種群における SIVmac239 とは異なる病原性 SIV 株 SIVsmE543-3 の感染実験では、SIVsmE543-3 の複製は制御されず約 1 年あまりでエイズを発症した。SIVmac239 Gag と SIVsmE543-3Gag のアミノ酸配列の相同性は約 88.9% と非常に高く (33)、Gag<sub>206-216</sub> エピトープ配列は SIVmac239 と SIVsmE543-3 とで完全に一致していた (図 3a)。ワクチンにより Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL 反応は誘導されていたが、SIVsmE543-3 感染後にその二次反応は認められず GagL216S 変異の選択も認められなかった。更なる解析により、Gag<sub>206-216</sub> エピトープの 1 アミノ酸前に位置する Gag205 番目のアミノ酸配列の違い (SIVmac239Gag205 番目はアスパラギン酸 (D)、SIVsmE543-3Gag205 番目はグルタミン酸 (E)) により Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL は SIVmac239 を認識するが、SIVsmE543-3 は認識できないことが示された (34)。

従って、SIVmac239 における GagD205E 変異は Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL から逃れたエスケープ変異と考えられる。しかし、これまで SIVmac239 感染 1、2 年後の MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia を有し Gag<sub>206-216</sub> 特異的 CTL 反応を誘導していることを確認しているサル群で、GagL216S 変異は観察されたが、GagD205E 変異を選択している個体は認められなかった。これは、GagD205E 置換が、GagL216S よりもウイルス複製能を低下する可能性があることを示唆する。

そこで私は、この Gag205 番目のアミノ酸置換による SIV 複製能への影響を調べることにした。まず SIVmac239 野生型の Gag205 番目を D から E に置換した SIVmac239Gag205E 変異体を作製し、*in vitro* での複製能を検討した。この SIVmac239Gag205E 変異体のサル T 細胞における複製能は、野生型に比べ低下していた。興味深いことに、この SIVmac239Gag205E を継代すると新たな代償性変異 (GagV340M) が加わり複製能が回復することが明らかとなった。Gag205 は Gag がコードする CA 内の NTD に位置するのに対し、今回新たに見出された代償性変異は CA の CTD に位置していた。CA 六量体構造シミュレーション解析により両者のアミノ酸の分子間相互作用が示唆された。MHC-I ハプロタイプ 90-120-Ia を有するサルの SIV 感染慢性期の解析では、この Gag205D-Gag340V および Gag205E-Gag340M の相互作用の重要性を示す結果が提示された。本研究では NTD の複製能の低下を CTD の変異が代償した。NTD-CTD 分子間相互作用に因るものと考えられる複製能の回復は HIV においてもこれまでに報告はない。本研究は CA NTD-CTD の機能的相互作用のための構造上の制約を新たに提示するものである。

## 2 材料と方法

---

### 2.1 変異ウイルスの作製

SIVmac239 感染性クローン DNA、pBRmac239 をもとに、下記の変異導入用プライマーを用いて site-directed mutagenesis を行い (30)、gag 領域に変異を有する変異型 SIVmac239 分子クローンを作成した。

変異導入用プライマー：

Gag205E 変異導入用プライマーセット

5'-<sup>1903</sup>gct atg cag att atc aga gag att ata aac gag gag gct gc<sup>1943</sup>-3'

5'-<sup>1943</sup>gc agc ctc ctc gtt tat aat ctc tct gat aat ctg cat agc<sup>1903</sup>-3'

Gag312P 変異導入用プライマーセット

5'-<sup>2227</sup>gca gaa cag aca gat ccg gca gta aag aat tgg<sup>2260</sup>-3'

5'-<sup>2260</sup>cca att ctt tac tgc cgg atc tgt ctg ttc tgc<sup>2227</sup>-3'

Gag340M 変異導入用プライマーセット

5'-<sup>2313</sup>gaa ggg gct ggg tat gaa tcc cac cct aga aga aat gc<sup>2350</sup>-3'

5'-<sup>2350</sup>gc att tct tct agg gtg gga ttc ata ccc agc ccc ttc<sup>2313</sup>-3'

(プライマーの両端の数値は SIVmac239 の塩基配列番号を表している。)

(下線を付けた塩基が変異導入部位である。)

野生型および作成した変異型 SIVmac239 クローン DNA を、Lipofectamine™ LTX PLUS (Invitrogen) を用いてアフリカミドリサル腎臓細胞株化細胞 COS-1 細胞およびヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞に遺伝子導入し、10 % ウシ胎児血清を含む培地で培養し、翌日に培地交換を行い、培養 48 時間後、培養上清を回収した。培養上清を 0.45  $\mu$ m Tuffyn Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN4184 (PALL life science) で濾過した後、実験用ウイルスストックとして -80°C 超低温フリーザーで凍結保存した。ウイルスストック中のウイルス量は、reverse transcription (RT) assay を用いて測定した (35)。

RT assay は以下に記す。ウイルス溶液 5  $\mu$ L に 0.05  $\mu$ L の [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]d-TTP (10  $\mu$ Ci /  $\mu$ L) (Perkin Elmer) と 0.025 mL の RT cocktail (60 mM Tris-HCl pH 7.8, 75 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % NP-40, 1.0 mM EDTA, 5  $\mu$ g / mL polyA (Pharmacia), 0.16  $\mu$ g / mL oligo dT (Pharmacia)) を加え 37 °C、90 分間反応させウイルスの逆転写酵素産物に <sup>32</sup>P で放射標識した T を取り込ませた。反応液中 5  $\mu$ L を DEAE paper (Whatman) にアプライし 10 倍希釈した 20 x SSC Buffer Stock Solution (20x) (nacalai tesque) で洗浄した。洗浄後、RT 活性を定量するため 1450 Micro Beta TRILUX RI・グロー一発光測定システム (Perkin Elmer) で放射線量を計測した。

## 2.2 ウイルス複製能の検討

RT assay にて測定した RT 活性が  $1.25 \times 10^5$  cpm あるいは  $5 \times 10^5$  cpm に相当する野生型および変異型ウイルスストックを、各々  $5 \times 10^5$  個のサル T 細胞株である HSC-F 細胞 (36) あるいはヒト T 細胞である MT-4 R5 細胞 (37) に感染させた。HSC-F とは herpesvirus saimiri 感染で不死化させたカニクイザル T 細胞株であり、10 % ウシ胎児血清、10 U/ mL interleukin-2 (Roche Diagnostics) 、1 % HEPES (Invitrogen) 、0.1 % 2-メルカプトエタノール (Invitrogen) を含む培地で培養を行った。一日毎に 14 日間培養上清の回収を行った。経時的に回収した培養上清は、RT assay を用いて含有ウイルス量を測定し、ウイルス感染増殖能を検討した。

## 2.3 SIVmac239Gag205E 変異体の継代実験

SIVmac239Gag205E に関しては、継代実験を行った。2.2 同様に、 $1.25 \times 10^5$  cpm 相当の COS-1 細胞産生 SIVmac239Gag205E を  $5 \times 10^5$  個の HSC-F 細胞に感染させ、実験開始から 10 日後、培養上清中の RT 活性を RT assay により測定した (1<sup>st</sup>

culture)。1.25 x 10<sup>5</sup> cpm に相当する量の 10 日目の培養上清を、5 x 10<sup>5</sup> 個の新たな HSC-F 細胞に感染させた (2<sup>nd</sup> culture)。1<sup>st</sup> culture の 10 日目および 2<sup>nd</sup> culture の 6 日目の培養上清から High Pure Viral Kit (Roche diagnostics) を用いてウイルス RNA の抽出を行い、抽出したウイルス RNA を鋳型にして RT-PCR を行った。RT-PCR は、One-step RNA PCR kit (宝酒造株式会社) を用いて行った。RT-PCR の設定は RT 反応 50 °C-30 分、94 °C-2 分とし、PCR 反応は (94 °C-30 秒、55 °C-30 秒、72 °C-1000 bp あたり 60 秒) を 30 サイクル行った。PCR 産物はエチジウムブロマイド含有 1 %アガロースゲルで電気泳動後、増幅産物の有無を確認し、増幅した DNA 断片は、PCR clean-up mini-kit (FavorPrep) を用いて精製した。精製後、dye-terminator 法により塩基配列の解析を行った。下記のプライマーを使用し、PCR 反応は (96 °C-10 秒、50 °C-10 秒、60 °C-4 分) を 20 サイクル行った。PCR 産物をエタノール沈殿し、HiDi Formamide に溶解した後、ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) を使用して塩基配列の解析を行った。試験は 4 回施行した。

#### RT-PCR プライマーセット

5'-<sup>1194</sup>gta cca gac ggc gtg agg<sup>1211</sup>-3'

5'-<sup>3016</sup>ttg cct aaa act tct att tct ac<sup>3039</sup>-3'

#### シーケンス用プライマー

5'-<sup>1456</sup>ctg ttg gag aac aaa gaa gga tgt<sup>1480</sup>-3'

5'-<sup>1760</sup>cga gaa cat taaatg cct ggg<sup>1781</sup>-3'

5'-<sup>2103</sup>atg gat cca act ggg gtt gc<sup>2123</sup>-3'

## 2.4 Viral competition assay

複製能を比較したい変異ウイルス 2 種類を、それぞれ RT 活性比が 1 : 1 (2,000 cpm : 2,000 cpm)、1 : 4 (2,000 cpm : 8,000 cpm) ないし 4 : 1 (8,000 cpm : 2,000 cpm) に相当する分量を測り取り、 $5 \times 10^5$  個の HSC-F 細胞に共培養させた。感染開始後一日毎に 18 日間にわたり培養上清を回収した。またウイルスの複製を促進するため、実験開始から 6 日後、12 日後に、 $5 \times 10^5$  個の HSC-F 細胞に再感染させた。その際、6 日目、12 日目に回収した培養上清中の RT 活性を測定し開始時の RT 活性の総和に相当する量を再感染させた。経時的に回収した 6、18 日目の培養上清から High Pure Viral Kit (Roche diagnostics) を用いてウイルス RNA の抽出を行い、抽出したウイルス RNA を鋳型にして RT-PCR を行った。RT-PCR は、One-step RNA PCR kit (宝酒造株式会社) を用いて行った。RT-PCR の設定は RT 反応  $50\text{ }^{\circ}\text{C}-30$  分、 $94\text{ }^{\circ}\text{C}-2$  分とし、PCR 反応は ( $94\text{ }^{\circ}\text{C}-30$  秒、 $55\text{ }^{\circ}\text{C}-30$  秒、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}-1,000\text{bp}$  あたり 60 秒) を 30 サイクル行った。PCR 産物はエチジウムブロマイド含有 1 %アガロースゲルで電気泳動後、増幅産物の有無を確認し、増幅し

た DNA 断片は、PCR clean-up mini-kit (FavorPrep) を用いて精製した。精製後、dye-terminator 法により塩基配列の解析を行った。下記のプライマーを使用し、PCR 反応は (96 °C – 10 秒、50 °C – 10 秒、60 °C – 4 分) を 20 サイクル行った。PCR 産物をエタノール沈殿し、HiDi Formamide に溶解した後、ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) を使用して塩基配列の解析を行った。塩基配列の結果を基に、どちらの変異ウイルスが優勢となるか解析、検討した。2 回施行した。

#### RT-PCR プライマーセット

5'-<sup>1194</sup>gta cca gac ggc gtg agg<sup>1211</sup>-3'

5'-<sup>3016</sup>ttg cct aaa act tct att tct ac<sup>3039</sup>-3'

#### シーケンス用プライマー

5'-<sup>1456</sup>ctg ttg gag aac aaa gaa gga tgt<sup>1480</sup>-3'

5'-<sup>1760</sup>cga gaa cat taaatg cct ggg<sup>1781</sup>-3'

5'-<sup>2103</sup>atg gat cca act ggg gtt gc<sup>2123</sup>-3'

## 2.5 構造シミュレーション解析

構造シミュレーション解析は、共同研究者の横山先生、佐藤先生のご協力をお借りして行った。

2.00 Å分解能の HIV-1 CA NTD (PDB コード: 1M9C (38))、1.70 Å分解能の HIV-1 CA CTD (PDB コード: 1A8O (5))、そして 1.90 Å分解能の HIV-1 六量体 CA (PDB コード: 3H47 (39)) の結晶構造を RCSB Protein Data Bank から得た (40)。

SIVmac239 単量体の 3次元(3D)モデルは、Molecular Operating Environment (MOE) version 2008.1002 (Chemical Computing Group Inc., Quebec, Canada) の MOE-Align および MOE-Homology を用いてホモロジーモデリングにより予測された (41,42)。

更に、MOE により 1つのホモロジーモデリングにつき 25個の中間体モデルが得られ、generalized Born/volume integral methodology に則って最も妥当性の高い中間体モデルを持つ 3D モデル構造を選択した (43)。最終的な 3D モデル構造は、MOE に搭載されている AMBER99 で力場 (44) と、同じく MOE に搭載されている generalized Born model の水溶媒和 (45) を組み合わせることで、熱力学的にタンパク質立体構造を最適化した。更に MOE に搭載されている Ramachandran plot により統計的データから得られた異常構造を割り出し、タンパク質立体構造最適化を行った。SIVmac239 CA 六量体のタンパク質予測立体構造は、HIV-1 CA 六量体の結晶構造 (39) の情報を基に、MOE でシミュレーションした SIVmac239 CA 単量体から構築した。

## 2.6 前期過程の検討

$5 \times 10^5$  cpm に相当するウイルスを  $5 \times 10^5$  個の LuSIV 細胞に感染させた。

LuSIV 細胞は、SIVmac239 Long Terminal Repeat (LTR) の下流に Luciferase を組み込んだ遺伝子をヒト T 細胞株 CEM x 174 細胞に導入したものである。10 % ウシ胎児血清、Hygromycin 含有培地で培養を行った。LuSIV assay は、SIV 感染後に発現する SIV 由来の Tat 依存的にルシフェラーゼを発現発光し、その発光量を測定することで感染度を定量する方法である。LuSIV 細胞感染 20 時間後、細胞を培養液ごと回収し、8,000 rpm, 1 分の遠心を行い、上清を取り除いた。沈殿物に Reporter lysis buffer (Promega Corp) を加え溶解しサンプルを調整した。調整サンプルを 8,000 rpm、2 分で遠心後、ルシフェラーゼ活性を測定するために、lysis buffer で溶解したサンプルを luciferin と混合し、GloMax™96 Microplate Luminometer (Promega Corp) を用いて計測した。

## 2.7 後期過程の検討

野生型および作成した変異型 SIVmac239 クローン DNA を、Lipofectamine™

LTX PLUS (Invitrogen) を用いてアフリカミドリサル腎臓細胞株化細胞 COS-1 細胞に遺伝子導入し、10 % ウシ胎児血清を含む培地で培養し、翌日に培地交換を行い、培養 48 時間後、培養上清を回収した。培養上清を 0.45  $\mu$ m Tuffyn Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN4184 (PALL life science) で濾過した後、RT assay を用いて測定した。

## 2.8 In vitro stability assay

野生型および作成した変異型 SIVmac239 分子クローン DNA を、2.1 に示した方法に則り COS-1 細胞に導入し、48 時間後の培養上清を回収し、0.45  $\mu$ m Tuffyn Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic PN4184 (PALL life science) で濾過後、RT 活性を測定した。等 RT 活性かつボリュームを 7ml に調整するため培養に使用する培地で補正した。4.0 ml 20 %スクロース入り PBS の上に 7.0 ml ウイルス液を重層し、SW41 rotor (Beckman Instruments, Fullerton CA) を用いて 35,000 rpm、75 分、4 °C超遠心を行った (46)。超遠心後、濃縮したウイルスを 250  $\mu$ L PBS で溶解し、スクロースステップグラディエントを行う際のウイルスサンプルとした。スクロースステップグラディエントは、以下の順に SW55 centrifuge tube に

重層した。2.0 ml 60 %スクロース入り PBS、2.1 ml 20 %スクロース入り PBS、100  $\mu$  L TritonX-100、最上部に 500  $\mu$  L 濃縮ウイルスサンプルを重層した。SW55Ti rotor (Beckman Instruments, Fullerton CA) にて 35,000 rpm、60 分、4 °C の超遠心を行った。超遠心後、上層から 1.1 ml ずつ回収し、3 つの区画に分けた (上から a, b, c)。1.1ml のうち、100  $\mu$  L を RT assay 用サンプルに、残りの 1 ml は 4 x Sample buffer を加えウエスタンブロット用サンプルとした。

ウエスタンブロットは以下の手順で行った。18 cm X 16 cm の Hoefer Glass Plates (Amersham Biosciences) にセパレートゲルとして 12.5 % ポリアクリルアミドゲル、スタッキングゲルとして 4.5 % ポリアクリルアミドゲルを用いてゲルを作成した。ウエスタンブロット用サンプルは、10 分、95 °C 加熱して後、ゲルに 120  $\mu$  L ずつアプライし、電圧 60 V、16 時間で SDS-PAGE にて泳動を行った。泳動後、PVDF メンブレン (Millipore corporation) に電圧 50 V、2 時間で転写した。一次抗体に Simian-human immunodeficiency virus (SHIV89.6) (47,48) 感染サル個体の感染 137 週目の血清 (500 倍希釈)、二次抗体に Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) コンジュゲート抗サル IgG (5,000 倍希釈) を室温、各 1 時間反応させた。Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo) を用いて検出し、ChemiDoc XRS Plus (Bio Rad) で撮影を行った。

## 2.9 MHC ハプロタイプ 90-120-Ia を有する SIVmac239 感染サル慢性期の解析

MHC ハプロタイプ 90-120-Ia を有する SIVmac239 感染ビルマ産アカゲザル (rhesus macaques [*Macaca mulatta*]) (R01-007) の gag 領域のアミノ酸配列の解析を行った。なお、このサルは過去の実験で用いられ、DNA プライム・Gag 発現 SeV ベクターブースト予防エイズワクチン接種後 SIVmac239 チャレンジ実験を行ったサル個体 (R01-007) で、感染第 8 週のセットポイント期でウイルス複製制御に至り、ウイルス血症が検出されなくなったものである。ワクチンによって誘導された Gag 特異的 CTL による SIVmac239 野生型ウイルス排除の関与が示されており、MHC-I ハプロタイプに拘束される Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL 反応からのエスケープ変異 GagL216S をもつウイルスが急速に選択されていた (19)。感染後期第 58 週の時点で GagL216S、GagD244E、GagI247L、GagA312V、GagA373T といった Gag 特異的 CTL 反応からのエスケープ変異が複数蓄積することにより、ウイルス血症の再出現が認められた、その後高いウイルス血症を持続したサルである (49) (図 16)。

動物実験は、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターにおいて、予防衛生協会の協力のもと、国立感染症研究所および医薬基盤研究所の動物実験取扱規約に則って行われた。血液採取、ワクチン接種、ウイルスチャレンジ、抗

体投与などの処置は、塩酸ケタミン 10 mg / kg 筋肉内注射による全身麻酔下で行われた。サルの MHC-I ハプロタイプについては、東京医科歯科大学の木村彰方教授により同定された。

## 3 結果

---

### 3.1 野生型および SIVmac239Gag205E 変異体の複製能の比較

MHC ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性アカゲザル群への SIVmac239 感染実験と SIVsmE543-3 感染実験で Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL 反応の誘導の違いの原因として認められた Gag の 205 番目の違いが、ウイルス複製能に与える影響について *in vitro* で検討を行った。SIVmac239 の分子クローンである pBRmac239 をもとに site-directed mutagenesis を行い、SIVmac239GagD205E クローンを作製した。Gag205 番目は SIVmac239 ではアスパラギン酸 (D) に対し、SIVsmE543-3 ではグルタミン酸 (E) であり SIVmac239Gag205E 変異体は SIVmac239 の Gag205 番目 D のみを SIVsmE543-3 由来の E にしたものである (図 3)。作製した分子クローン DNA をサル細胞の COS-1 細胞ならびにヒト細胞の HeLa 細胞に導入し、ウイルスストックを作製し、その逆転写酵素活性を測定した。COS-1 産生ウイルス、HeLa 産生ウイルスともに十分な酵素活性が得られた。逆転写酵素活性で規準化した COS-1 産生ないし HeLa 産生ウイルスを、各々サル T 細胞株 HSC-F 細胞およびヒト T 細胞株 MT-4 R5 細胞に感染させ上清中に産生されるウイルス量を経時的に測定した。SIVmac239 野生型および SIVmac239Gag205E 変異体ともに HSC-F 細胞、MT-4 R5 細胞への感染性を有したが、その複製能には差が認められ SIVmac239Gag205E 変異体のピークは野生型に比べ遅れることが観察された (図

4)。この結果から、SIVmac239Gag205E 変異体は野生型より複製能が低いことが示唆された。ウイルス産生株がサル細胞株 COS-1 細胞、ヒト細胞株 HeLa 細胞に左右されず、また感染細胞がサル T 細胞株 HSC-F 細胞、ヒト T 細胞株 MT-4 R5 細胞に関わらず同様の結果が得られたことから、細胞依存的な現象ではないと考えられる (図 4)。

### 3.2 SIVmac239Gag205E 変異体の継代実験

この複製能の低下した SIVmac239Gag205E 変異体の継代実験を行い、その増殖パターンを比較的長期にわたって観察した (図 5)。SIVmac239Gag205E 変異体の継代一代目の感染 10 日目培養上清から RNA を抽出し RT-PCR を行った後、gag 領域の塩基配列を調べたところ、特に大きな変化はなく SIVmac239Gag205E が優勢だった。しかしながら、この SIVmac239Gag205E 感染 10 日目の培養上清を非感染 HSC-F 細胞に感染させ継代二代目を行ったところ、Gag205E の変異は維持されたまま新たな変異の出現が観察された。新たに加わった変異は、Gag340 番目に認められ、4 試験中 2 試験で、野生型のバリニン (V) よりメチオニン (M) が優勢となっていた。興味深いことに、Gag340 番目のアミノ酸は SIVmac239 では V、

SIVsmE543-3 では M であり、この違いと結果が一致していた。なお、CA 領域内には Gag205、340 以外は変異が認められなかった。

### 3.3 GagV340M 変異の SIVmac239Gag205E 変異体複製能に及ぼす影響

次に SIVmac239Gag205E への GagV340M が及ぼす影響を検討するため、Gag205E に加え Gag340 番目を V から M に置換した SIVmac239Gag205E340M 変異型 DNA クローンを site-directed mutagenesis により作製した (図 3b)。また上記で記載したように、SIVmac239Gag205E 継代実験により得られた GagV340M という変異は、SIVmac239 由来の V から SIVsmE543-3 由来のアミノ酸 (M) と一致していたという事実から、SIVmac239 と SIVsmE543-3 の CA 相同配列で異なる部位かつ Gag340 番目と同じく C 末端ドメインに位置するアミノ酸である Gag312 番目に着目し、Gag205E と Gag312 との関係性についても検討を行った。具体的には、Gag205E に加え、Gag312 番目を SIVmac239 由来のアラニン (A) から SIVsmE543-3 由来のプロリン (P) に変え SIVmac239Gag205E312P 変異体を作成した (図 3)。各々 COS-1 細胞に導入し産生したウイルスを、サル T 細胞株 HSC-F 細胞に感染させ上清中に産生されるウイルス量を経時的に測定した (図 6)。

SIVmac239Gag205E340M 変異体および SIVmac239Gag205E312P 変異体の複製能は、ともに Gag205E 変異が入っているのにも関わらず野生型とほぼ同程度まで回復していた。この結果から、Gag340M、Gag312P 変異の追加は SIVmac239Gag205E の複製能の低下を補う代償性変異であることが示唆された。ただし、SIVmac239Gag205E 継代実験では、GagV340M 変異は認められたが、GagA312P 変異は見られなかった。このことから、SIVmac239 の CA において Gag205D-340V および Gag205E-340M が機能的なコンビネーションに対し、Gag205E-340V は非機能的な組み合わせである可能性が考えられた。

### 3.4 Competition assay による複製能の解析

SIVmac239 野生型、SIVmac239Gag205E、SIVmac239Gag205E312P、SIVmac239Gag205E340M これら 4 つの変異ウイルスの複製能を正確に比較するため viral competition assay を行った。例えば変異ウイルス A と変異ウイルス B の複製能を比較する場合においては、A ウイルスと B ウイルスをサル T 細胞株 HSC-F 細胞に共感染し、時間経過とともに、どちらの変異ウイルスが優勢となるか解析を行った (図 7)。まず、SIVmac239Gag205E との比較に焦点を当てた。

SIVmac239Gag205E 変異ウイルスと SIVmac239 野生型ウイルスの比較では全ての感染比において野生型が選択されていたことから、SIVmac239Gag205E の方が SIVmac239 野生型よりも複製能が低いことが示された (表 1)。同様に SIVmac239Gag205E 変異ウイルスと SIVmac239Gag205E312P 変異ウイルスあるいは SIVmac239Gag205E340M 変異ウイルスとの比較においても、SIVmac239Gag205E は SIVmac239Gag205E312P および SIVmac239Gag205E340M は低い複製能を示した (表 1)。これらの competition assay の結果は、SIVmac239Gag205E は SIVmac239 野生型、SIVmac239Gag205E312P そして SIVmac239Gag205E340M と比較して複製能が低下していることを裏づけるものである。更に Gag205E 変異によりウイルス複製能は低下するが、GagA312P あるいは GagV340M 変異の追加によりその複製能が回復することが明らかとなった。

次に、SIVmac239 野生型と Gag205E の代償性変異と考えられる

SIVmac239Gag205E312P あるいは SIVmac239Gag205E340M と competition assay を行った。SIVmac239 野生型と SIVmac239Gag205E312P 変異ウイルスの比較では、野生型が優勢であった。これに対し、SIVmac239Gag205E340M は少なくとも SIVmac239 野生型と同じレベル以上の複製能を有していると考えられた (表 1)。これらの結果は、GagD205E 変異による複製能の低下を GagA312P 変異の付加により部分的に、GagV340M 変異の付加では完全に戻すことを示している。また、

SIVmac239 野生型と SIVmac239Gag205E340M の competition assay により、培養 6 日目では認められなかった培養 18 日目での選択は、SIVsmE543-3 型の Gag205E-340M という組み合わせが SIVmac239 型の Gag205D-340V の組み合わせよりも SIV CA において、同等かそれ以上機能的に働いている可能性を示唆している。

### 3.5 CA タンパク質構造シミュレーション解析からみた Gag205 と Gag340 の関係

SIVmac239Gag205E の複製能を GagV340M 変異により回復するという結果は、Gag205 番目と Gag340 番目が相互作用している可能性を支持する。HIV-1 の CA 構造は既に報告されており、構造解析から構造上 2 つに分けられ各々 N 末端ドメイン (NTD) と C 末端ドメイン (CTD) と言われている。SIVmac239 の CA も NTD と CTD から構成されると考えられており、SIVmac239 において NTD は Gag136 から Gag283 までのアミノ酸領域であり、構成要素は  $\alpha$  ヘリックス 1 からヘリックス 7 ならびにサイクロフィリン結合ループを含む。一方、CTD は Gag284 から Gag364 アミノ酸領域を指し、 $\alpha$  ヘリックス 8 からヘリックス 12 そして MHR を含んでいる。Gag205 番目は、CA NTD の  $\alpha$  ヘリックス 4 内に位置し、他方

Gag340 番目は、CTD の  $\alpha$  ヘリックス 10-ヘリックス 11 ループに位置すると考えられる。現時点では SIV CA の結晶構造が報告されておらず、その構造シミュレーション解析は HIV-1 CA 構造を基に行われることが一般である。まず、CA 単量体構造シミュレーション解析により Gag205-Gag340 間の相互作用を検討したところ、CA 単量体では Gag205 と Gag340 は離れた場所に位置し Gag205-Gag340 間の分子内相互作用する可能性は低いと考えられた (図 8)。

成熟ウイルスでは、カプシドは約 250 個の CA 六量体と約 12 個の CA 五量体から成る円錐型様構造をしていることが知られており (39,50-53)、近年報告された NMR 解析および結晶構造解析による HIV-1 CA 六量体の構造解析を基に (図 9)、SIVmac239 六量体ホモロジーダイナミックモデリングを行った。その際、CA 六量体において、ある CA 分子の NTD 内の Gag205 残基と、その CA 分子と隣り合った CA 分子の CTD 内の Gag340 残基が非常に隣接していることが予測された。このことは、CA 六量体での Gag205Gag-340 間の分子間相互作用が存在することを示唆するものである (図 10a)。

加えて、Gag312 についても構造シミュレーション解析を用いて検討した。

Gag312 番目は、CTD の  $\alpha$  ヘリックス 8-ヘリックス 9 ループに位置すると予測された。Gag340 同様、CA 単量体では Gag312 は Gag205 と離れた場所に位置してい

たが CA 六量体では、Gag205 と Gag12 の分子間相互作用の可能性を示唆された(図 10a)。

### 3.6 ウイルスライフサイクル前期および後期過程のスクリーニング

感染実験および competition assay の結果より、SIVmac239Gag205E は SIVmac239 野生型よりも顕著に複製能が低下していることが明らかとなった。そこで、GagD205E 変異がウイルスライフサイクルの前期過程ないし後期課程のどちらに影響を及ぼしているかをスクリーニングした。

後期課程のスクリーニングでは、ウイルスストックを作製した時と同様の方法を用いて野生型および変異体 DNA クローンをサル細胞株 COS-1 細胞に導入し、産生ウイルス量を培養上清中の逆転写酵素活性を測定、比較した。COS-1 細胞から後期過程を経て産生された SIVmac239 野生型、SIVmac239Gag205E、SIVmac239Gag205E312P、SIVmac239Gag205E340M 変異体は、ほぼ同等の逆転写酵素活性が得られた(図 11)。

次に、LuSIV 細胞を用いて前期過程を検討した。LuSIV 細胞は SIVmacLTR-luciferase 遺伝子をヒト T 細胞株 CEMx174 細胞に導入した細胞で、SIV

感染後発現する SIV 由来の Tat 依存的にルシフェラーゼを発現する (図 12)。SIV 感染 24 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼの発現量を解析することで、感染前期過程の効率を測定できる。LuSIV 細胞に SIVmac239 野生型、SIVmac239Gag205E、SIVmac239Gag205E312P、SIVmac239Gag205E340M ウイルスを感染させ 24 時間後ルシフェラーゼ発現量を測定したところ、SIVmac239Gag205E は、SIVmac239 野生型、SIVmac239Gag205E312P、SIVmac239Gag205E340M のルシフェラーゼの発現量に比べ顕著な低下が認められた。SIVmac239 野生型、SIVmac239Gag205E312P、SIVmac239Gag205E340M 間では、差は見られなかった (図 13)。従って、SIVmac239Gag205E 変異体では細胞内に侵入してから、逆転写により合成された viral DNA の宿主染色体への組み込みまでを含む前期過程の効率の低下が認められた。

### 3.7 *In vitro* におけるウイルスコアの安定性の検討

GagD205E 変異により CA 六量体の分子間相互作用が阻害されることが構造モデリング解析から予測された。この場合、SIV のコアの安定性にも影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで *in vitro* core stability assay (図 14) を行い SIV ウイルス間でコアの安定性に差が生じるかどうかを検討した。まず、逆転写酵素活性価

で合わせたウイルスを 20 %スクロースで濃縮した。そして、60 %スクロース、20 %スクロース、Triton X-100 の順に重層した上層にこの濃縮ウイルスを重層し超遠心を行い、三分画に分けて回収した。三分画中の含有 CA タンパク量はウエスタンブロッティングで検出、更に c 分画に含まれるウイルス量を RT assay で測定した。Triton X-100 が無の場合、CA タンパクは a および c 両分画に検出され、他方 1 % Triton X-100 存在下では、界面活性剤処理により CA が全て分解されるため a 分画にのみ検出された。In vitro core stability assay では、一般に a 分画にはウイルス様タンパク質、凝集したタンパク質や Triton X-100 に可溶化したタンパク質が見られ、c 分画にウイルスコアが蓄積されると報告されており、本実験においても Triton X-100 の濃度に依存して、c 分画の成熟 CA タンパク質の存在量が異なること、比例して a 分画のタンパク量も変化することが確認された。そこで、in vitro core stability assay を用いて SIVmac239 野生型コアと SIVmac239Gag205E 変異体コアで感受性の異なる Triton X-100 濃度のスクリーニングを行った。0.06 %、0.09 %、0.135 % Triton X-100 存在下で行ったところ、0.09 %と 0.135 %では SIVmac239 野生型、SIVmac239Gag205E 変異体ともに c 分画にウイルスコアの存在が認められず a 分画のみにバンドが得られた。しかし、0.06 %で SIVmac239Gag205E 変異体は 0.09 %、0.135 %同様の結果が得られたのに対し、SIVmac239 野生型は a、c 両分画に CA タンパクを検出した。この結果から 0.06 % Triton X-100 に対する感受性が、野生型と SIVmac239Gag205E の CA コアで異なることが明らかとなった (図 15)。更に、機能的相互作用が示唆された SIVmac239Gag205E312P、SIVmac239Gag205E340M のコアについても検討するた

め、0.06 % Triton X-100 で in vitro stability assay を施行した。SIVmac239Gag205E312P、SIVmac239Gag205E340M とともに、SIVmac239 野生型のパターンを取った。つまり、0.06 % Triton X-100 存在下で c 分画にウイルスコアが認められた (図 15)。以上をまとめると、0.06% Triton X-100 に SIVmac239Gag205E コアは、SIVmac239 野生型、SIVmac239Gag205E312P および SIVmac239Gag205E340M コアと比較して感受性が高いことが示され、GagD205E 変異により失われたウイルスコアの安定性を GagA312P ないし GagV340M を加えることで野生型レベルまで回復する可能性が示唆された。

### 3.8 MHC ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性サルの SIVmac239 野生型感染慢性期における解析

所属する研究室で以前行われた SIVmac239 感染実験および SIVsmE543-3 感染実験の結果から、GagD205E 変異は、Gag<sub>206-216</sub> 特異的 CTL 反応からのエスケープに結びつくと考えられる。私は、今まで研究室で行われてきた実験で得られた血漿サンプルのうち (49,54)、Gag<sub>206-216</sub> 特異的 CTL 反応を誘導している 90-120-Ia 陽性ビルマ産アカゲザルの SIVmac239 野生型感染慢性期において GagD205E が選択されているか否か、また Gag205 と Gag340 の相互作用が認められるかを調べた。

この個体において、感染慢性期 123 週では Gag<sub>206-216</sub> エピトープ特異的 CTL エ

スケープ変異である GagL216S 変異は維持されていたにもかかわらず、第 137 週になると野生型の Gag216L も出現し、最終的には感染 150 週になると Gag216L が優勢となっていた。この Gag216 番目のアミノ酸の変化に伴って、感染 123 週では検出されなかった Gag205 変異が、感染 137 週で GagD205E 変異が出現し、感染 150 週では GagD205E が選択されていることが確認された。興味深い事に、この GagD205E の選択と同時に GagV340M が選択されていた（表 2）。これらの結果は、Gag205 番目と Gag340 番目の機能的相互作用の *in vivo* における根拠を示すものである。

## 4 考察

---

多様性の高いゲノムを有する HIV/SIV においてゲノム保存性の高いタンパク質の一つである Gag CA は、CTL 誘導ワクチンの抗原として有望である。しかし、CA におけるアミノ酸配列の拘束性に関しては、まだ不明な点が多く解明しなければならない。

本研究では、SIVmac239 の CA N 末端ドメインに位置する Gag205 アミノ酸 (D) を SIVsmE543-3 のアミノ酸 (E) に置換した SIVmac239Gag205E 変異ウイルスを作製し、その複製能を検討したところ、複製能は SIVmac239 野生型に比べ低下していた。この変異 SIV 感染の継代により、ウイルス複製能の回復に結びつく GagV340M 変異 (SIVmac239 の Gag340V から SIVsmE543-3 の Gag340M への変異) が更に生じるケースを見出した。SIVmac239 CA と SIVsmE543-3 CA 配列間の相違アミノ酸でかつ Gag340 番目と同じく CA C 末端ドメインに位置する Gag312 番目の変異 GagA312P も、GagD205E 変異の代償性変異であることが認められた。しかし、SIVmac239Gag205E 変異体継代実験では GagA312P 変異は選択されなかった。また、MHC ハプロタイプ 90-120-Ia を有する SIVmac239 感染サル個体の慢性期においても、Gag205E 変異一つの選択ではなく、Gag205E 変異と Gag340M 変異が同時に選択されている現象が認められた。これらの結果は、CA NTD の

Gag205 番目と CA CTD の Gag340 番目とが機能的相互作用していることを示唆し、CA の NTD-CTD 間の機能的相互作用のための構造上の制約を初めて提示するものである。

HIV/SIV Gag タンパク質は、Gag 前駆体として細胞質で合成される。合成された後、細胞膜に輸送されアセンブリーというプロセスで多量体形成によりウイルス粒子を形成する。そして粒子が膜から出芽すると同時に成熟が起こる。Gag 前駆体がウイルス自身のもつプロテアーゼによりプロセッシングを受け、MA、CA、NC、p6 となり非感染性から感染性のある成熟型粒子に変換される (55,56)。成熟ウイルスでは、ウイルスコアは約 250 個の CA 六量体と約 12 個の CA 五量体の複合体から成る円錐型様構造をとっている (39,50-53)。最近の NMR や結晶解析などの構造解析 (39,52,53,57-59) により、HIV-1 成熟時の CA 六量体の構造解析が行われ、その構造が報告された。成熟カプシドフラメン構造形成時、NTD-NTD、NTD-CTD そして CTD-CTD の 3 種類の相互作用から構成されることが明らかとなった。NTD-NTD 相互作用および NTD-CTD 相互作用は CA 六量体形成時に、CTD-CTD 相互作用は CA 六量体と隣接する CA 六量体間で重要となってくる。本研究で行ったシミュレーション解析により、NTD 内の Gag205 と CTD 内の Gag340 との相互作用は CA 単量体での分子内相互作用の可能性は低いですが、CA 六量体での分子間相互作用の可能性を示唆し、成熟ウイルスのコア形成に影響を及

ぼすことが考えられた。この可能性は、*in vitro* core stability assay の結果が支持している (図 15)。しかし、*in vitro* における界面活性剤に対するコアの安定性がどの程度 *in vivo* を反映しているのかは不明である (60)。

近年、精力的な研究により多くの HIV 増殖に関与する宿主因子が発見され報告されている。その中で CA に関与する宿主因子として Cyclophilin A (CypA) と Tripartite motif protein 5  $\alpha$  (TRIM 5  $\alpha$ ) が知られている。しかし、CypA は CA のヘリックス 4-ヘリックス 5 ループの CypA 結合ループと言われる 8 アミノ酸部位に結合することが言われており、本研究で取り上げた変異との関係性は低いと考えられる。また、TRIM5  $\alpha$  も Gag205 変異による SIV への影響はこれまでに報告されていない。これまでの HIV-1 CA 構造解析により六量体 CA での NTD-CTD 相互作用で、NTD 内のヘリックス 4 と隣接する CA の CTD 内のヘリックス 10-ヘリックス 11 ループが相互作用することが報告されている (52,61)。私が本実験で得られた結果は、六量体 CA におけるこの報告されている NTD-CTD 分子間相互作用にヘリックス 4 に位置する Gag205 とヘリックス 10-11 ループに位置する Gag340 が関与している可能性を提示する。

GagD205E 変異を有する六量体 CA の構造シミュレーション解析で、Gag205 と Gag340 間のスペースが狭くなり、その狭まったスペースは GagV340M 変異が加わることで野生型におけるスペースに戻ることが予想された (図 10b)。構造シミ

ユレーション解析により、SIVmac239Gag205E340M 変異体の Gag205 と Gag340 間の疎水性ポケットの大きさは SIVmac239 野生型と同程度であったが、SIVmac239Gag205E 変異体ではそのポケットが狭まり異なることが予想された。

GagL216S 変異および GagD205E 変異はともに Gag<sub>206-216</sub> 特異的 CTL 反応の認識からエスケープしている (19,34)。しかし、前者は SIVmac239 感染ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性マカクザルで通常選択される変異だ。この理由は、後者が前者よりもウイルス複製能を著しく低下させるのではないかと考えている。本研究で、ハプロタイプ 90-120-Ia 陽性マカクザル SIVmac239 感染慢性期に、GagD205E + GagV340M 変異が選択されることを見出した。このサル個体は、SIVmac239 感染初期の段階で急速に GagL216S 変異を選択していたが、感染後期になると GagL216S 変異が野生型に戻ると同時に GagD205E + GagV340M 変異に入れ替わった。これは、SIVmac239 が Gag<sub>206-216</sub> 特異的 CTL 抑制圧下で複製するには、GagL216S よりも GagD205E + GagV340M 変異のほうが有利であったためだと考えられる。

私は、SIVmac239Gag205E 変異体継代実験から Gag205E から野生型の Gag205D に戻るのではなく、新たに GagV340M 変異が付加されることを明らかにした。これは、GagV340M がプリンからプリン (グアニンからアデニン) への変化に対し、GagE205D (野生型に戻る形) がプリンからピリミジン (アデニンからチミン) への変化の確立が低いことが関与している可能性が考えられる。培養細胞での

SIVmac239Gag205E 継代実験により GagV340M の追加変異が出現したが、同様にサル個体においても GagD205E+GagV340M が選択された。このことは、CA NTD の Gag205 番目と CA CTD の Gag340 番目間に機能的相互作用の存在を示唆する重要な証拠である。これまで行われた多くの研究から HIV/SIV 感染に Gag 特異的 CTL 反応が効果的であることが示されてきており (7,31,62,63)、Gag は CTL 誘導ワクチンの抗原候補として有望である。しかし、複製能を犠牲にしても CTL の認識から逃れるために出現するエスケープ変異は、AIDS ワクチンデザインにとってはこれまで厄介な問題だった。だからこそ、構造上の拘束性に関与する変異を探しだしその部位をワクチンデザインのターゲットとするのは高い効果が期待でき重要な挑戦と言える。従って、本研究で示した機能的相互作用のための構造上の制約に携わる部位を明らかにすることは、ワクチン抗原デザインに有益な情報を新たに提示するであろう。また近年、CA コアの形成機序に注目が集まっている。機序を解明することは、その部位をターゲットとした阻害剤の開発につながる。これまで CA CTD に結合して阻害する CAI や CA NTD に結合して形成を阻害する CAP-1 が開発されたが、重篤な副作用を生じるため臨床応用には未だ至っていない。本研究においても新たに見出された NTD (205) -CTD (340) が作るポケットに入りこむような分子をデザインすることが出来れば、阻害剤の開発が可能かもしれない。このように機能的相互作用のための構造上の制約に携わる

必須部位を明らかにしていくことは、抗 HIV 薬の新たなターゲットも提示することとなるであろう。

## 5 参考文献

---

1. Coffin J: HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science*, 267:483-489,1995.
2. McMichael AJ, Rowland-Jones SL: Cellular immune responses to HIV. *Nature* , 410:980-987,2001.
3. Goulder PJ, Watkins DI: HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* , 4:630-640,2004.
4. Momany C, Kovari LC, Prongay AJ, Keller W, Gitti RK, Lee BM, Gorbalenya AE, Tong L, McClure J, Ehrlich LS, Summers MF, Carter C, Rossmann MG: Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein. *Nat Struct Mol Biol* , 3:763-770,1996.
5. Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler UK, Worthylake DK, Wang H, McCutcheon JP, Sundquist WI, Hill CP: Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science* , 278:849-853,1997.
6. Berthet-Colominas C, Monaco S, Novelli A, Sibai G, Mallet F, Cusack S: Head-to-tail dimers and interdomain flexibility revealed by the crystal structure of HIV-1 capsid protein (p24) complexed with a monoclonal antibody Fab. *EMBO J* , 18:1124-1136, 1997.

7. Goulder PJR, Watkins DI: Impact of MHC class I diversity on immune control of immunodeficiency virus replication. *Nat Rev Immunol*, 8:619-630, 2008.
8. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, McLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD: Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*, 68:4650-4655, 1994.
9. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB: Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 68:6103-6110, 1994.
10. Matano T, Shibata R, Siemon C, Connors M, Lane HC, Martin MA: Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol*, 72:164-169, 1998.
11. Jin X, Bauer DE, Tuttleton SE, Lewin S, Gettie A, Blanchard J, Irwin CE, Safrit JT, Mittler J, Weinberger L, Kostrikis LG, Zhang L, Perelson AS, Ho DD: Dramatic rise in plasma viremia after CD8+ T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*, 189:991-998, 1999.
12. Schmitz JE, Kuroda MJ, Santra S, Sasseville VG, Simon MA, Lifton MA, Racz P,

Tenner-Racz K, Dalesandro M, Scallon BJ, Ghayeb J, Forman MA, Montefiori DC, Rieber EP, Letvin NL, Reimann KA: Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*, 283:857-860, 1999.

13. Phillips RE, Rowland-Jones S, Nixon DF, Gotch FM, Edwards JP, Ogunlesi AO, Elvin JG, Rothbard JA, Bangham CR, Rizza CR, McMichael AJ: Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* , 354:453-459, 1991.
14. Borrow P, Lewicki H, Wei X, Horwitz MS, Peffer N, Meyers H, Nelson JA, Gairin JE, Hahn BH, Oldstone MB, Shaw GM: Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat Med*, 3:205-211, 1997.
15. Goulder PJ, Phillips RE, Colbert RA, McAdam S, Ogg G, Nowak MA, Giangrande P, Luzzi G, Morgana B, Edwards A, McMichael AJ, Rowland-Jones S: Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat Med* , 3:212-217, 1997.
16. Price DA, Goulder PJ, Klenerman P, Sewell AK, Easterbrook PJ, Troop M, Bangham CR, Phillips RE: Positive selection of HIV-1 cytotoxic T lymphocyte escape variants during primary infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:1890-1895, 1997.

17. Peyerl FW, Barouch DH, Yeh WW, Bazick HS, Kunstman J, Kunstman KJ, Wolinsky SM, Letvin NL: Simian-human immunodeficiency virus escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition at a structurally constrained epitope. *J Virol* , 77:12572-12578,2003.
18. Friedrich TC, Frye CA, Yant LJ, O'Connor DH, Kriewaldt NA, Benson M, Vojnov L, Dodds EJ, Cullen C, Rudersdorf R, Hughes AL, Wilson N, Watkins DI: Extra-epitopic compensatory substitutions partially restore fitness to simian immunodeficiency virus variants that escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response. *J Virol*, 78:2581-2585, 2004.
19. Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Nakamura H, Kano M, Sugimoto C, Mori K, Iida A, Hirata T, Hasegawa M, Yuasa T, Miyazawa M, Takahashi Y, Yasunami M, Kimura A, O'Connor DH, Watkins DI, Nagai Y: Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* , 199:1709-1718, 2004.
20. O'Connor DH, McDermott AB, Krebs KC, Dodds EJ, Miller JE, Gonzalez EJ, Jacoby TJ, Yant L, Piontkivska H, Pantophlet R, Burton DR, Rehrauer WM, Wilson N, Hughes AL, Watkins DI: A dominant role for CD8+-T-lymphocyte selection in simian immunodeficiency virus sequence variation. *J Virol*, 78:14012-14022, 2004.

21. Martinez-Picado J, Prado JG, Fry EE, Pfafferoth K, Leslie A, Chetty S, Thobakgale C, Honeyborne I, Crawford H, Matthews P, Pillay T, Rousseau C, Mullins JI, Brander C, Walker BD, Stuart DI, Kiepiela P, Goulder P: Fitness cost of escape mutations in p24 Gag in association with control of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 80:3617-3623, 2006.
22. Crawford H, Prado JG, Leslie A, Hué S, Honeyborne I, Reddy S, van der Stok M, Mncube Z, Brander C, Rousseau C, Mullins JI, Kaslow R, Goepfert P, Allen S, Hunter E, Mulenga J, Kiepiela P, Walker BD, Goulder PJR: Compensatory mutation partially restores fitness and delays reversion of escape mutation within the immunodominant HLA-B\*5703-restricted Gag epitope in chronic human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* , 81:8346-8351, 2007.
23. Schneidewind A, Brockman MA, Yang R, Adam RI, Li B, Gall SL, Rinaldo CR, Craggs SL, Allgaier RL, Power KA, Kuntzen T, Tung C-S, LaBute MX, Mueller SM, Harrer T, McMichael AJ, Goulder PJR, Aiken C, Brander C, Kelleher AD, Allen TM: Escape from the dominant HLA-B27-restricted cytotoxic T-lymphocyte response in Gag is associated with a dramatic reduction in human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* , 81:12382-12393, 2007.
24. Carrington M, O'Brien SJ: The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu Rev Med*, 54:535-551, 2003.

25. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Desrosiers RC, Lackner AA: Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*, 280: 427-431, 1998.
26. Picker LJ, Hagen SI, Lum R, Reed-Inderbitzin EF, Daly LM, Sylwester AW, Walker JM, Siess DC, Piatak M Jr, Wang C, Allison DB, Maino VC, Lifson JD, Kodama T, Axthelm MK: Insufficient production and tissue delivery CD4+ memory T cells in rapidly progressive simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med*, 10:1299-1314, 2004.
27. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M: Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, 434:1093-1097, 2005.
28. Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, Wang Y, Reilly C, Carlis J, Miller CJ, Haase AT: Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature*, 434: 1148-1152, 2005.
29. Picker LJ, Watkins DI: HIV pathogenesis: the first cut is the deepest. *Nat Immunol*, 6: 430-432, 2005.

30. Kestler HW 3rd, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC: Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* , 65:651-662, 1991.
31. Kawada M, Tsukamoto T, Yamamoto H, Iwamoto N, Kurihara K, Takeda A, Moriya C, Takeuchi H, Akari H, Matano T: Gag-specific cytotoxic T lymphocyte-based control of primary simian immunodeficiency virus replication in a vaccine trial. *J Virol*, 82:10199-10206, 2008.
32. Kobayashi M, Igarashi H, Takeda A, Kato M, Matano T: Reversion in vivo after inoculation of a molecular proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus with a cytotoxic-T-lymphocyte escape mutation. *J Virol* , 79:11529-11532, 2005.
33. Hirsch V, Adger-Johnson D, Campbell B, Goldstein S, Brown C, Elkins W, Montefiori D: A molecularly cloned, pathogenic, neutralization-resistant simian immunodeficiency virus, SIVsmE543-3. *J Virol* , 71:1608-1620,1997.
34. Moriya C, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Kawada M, Yamamoto H, Inoue M, Iida A, Shu T, Hasegawa M, Nagai Y, Matano T: Abrogation of AIDS vaccine-induced cytotoxic T lymphocyte efficacy in vivo due to a change in viral epitope flanking sequences. *Microbes Infect* , 10:285-292,2008.
35. Willey RL, Smith DH, Lasky LA, Theodore TS, Earl PL, Moss B, Capon DJ, Martin MA: In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of

the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J Virol* , 62:139-147, 1988.

36. Akari H, Mori K, Terao K, Otani I, Fukasawa M, Mukai R, Yoshikawa Y: In vitro immortalization of old world monkey T lymphocytes with herpesvirus saimiri: its susceptibility to infection with simian immunodeficiency viruses. *Virology* , 218:382-388, 1996.
37. Amara A, Vidy A, Boulla G, Mollier K, Garcia-Perez J, Alcamí J, Blanpain C, Parmentier M, Virelizier JL, Charneau P, Arenzana-Seisdedos F : G protein-dependent CCR5 signaling is not required for efficient infection of primary T lymphocytes and macrophages by R5 human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J.Virology*, Feb;77(4):2550-8, 2003.
38. Howard BR, Vajdos FF, Li S, Sundquist WI, Hill CP: Structural insights into the catalytic mechanism of cyclophilin A. *Nat Struct Mol Biol* , 10:475-481, 2003.
39. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, Sundquist WI, Hill CP, Yeager M: X-Ray Structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell* , 137:1282-1292,2009.
40. Deshpande N, Address KJ, Bluhm WF, Merino-Ott JC, Townsend-Merino W, Zhang Q, Knezevich C, Xie L, Chen L, Feng Z, Green RK, Flippen-Anderson JL, Westbrook J, Berman HM, Bourne PE: The RCSB Protein Data Bank: a redesigned

query system and relational database based on the mmCIF schema. *Nucleic Acids Res*, 33:D233–D237, 2005.

41. Song H, Nakayama EE, Yokoyama M, Sato H, Levy JA, Shioda T: A single amino acid of the human immunodeficiency virus type 2 capsid affects its replication in the presence of cynomolgus monkey and human TRIM5alphas. *J Virol* , 81:7280-7285, 2007.
42. Shirakawa K, Takaori-Kondo A, Yokoyama M, Izumi T, Matsui M, Io K, Sato T, Sato H, Uchiyama T: Phosphorylation of APOBEC3G by protein kinase A regulates its interaction with HIV-1 Vif. *Nat Struct Mol Biol* , 15:1184-1191, 2008.
43. Labute P: The generalized Born/volume integral implicit solvent model: estimation of the free energy of hydration using London dispersion instead of atomic surface area. *J Comp Chem*, 29:1693–1698, 2008.
44. Ponder JW, Case DA: Force fields for protein simulations. *Adv Protein Chem* , 66:27-85, 2003.
45. Onufriev A, Bashford D, Case DA: Modification of the generalized Born model suitable for macromolecules. *J Phys Chem B*, 104:3712–3720, 2000.
46. Khan MA, Aberham C, Kao S, Akari H, Gorelick R, Bour S, Strebel K: Human immunodeficiency virus type 1 Vif protein is packaged into the nucleoprotein

complex through an interaction with viral genomic RNA. *J Virol* , 75:7252-7265, 2001.

47. Matano T, Kano M, Nakamura H, Takeda A, Nagai Y: Rapid appearance of secondary immune responses and protection from acute CD4 depletion after a highly pathogenic immunodeficiency virus challenge in macaques vaccinated with a DNA prime/Sendai virus vector boost regimen. *J Virol* , 75:11891-11896, 2001.
48. Shibata, R., F. Maldarelli, C. Siemon, T. Matano, M. Parta, G. Miller, T. Fredrickson, and M. A. Martin: Infection and pathogenicity of chimeric simian-human immunodeficiency viruses in macaques: determinants of high virus loads and CD4 cell killing. *J. Infect. Dis.* 176:362-373, 1997.
49. Kawada M, Igarashi H, Takeda A, Tsukamoto T, Yamamoto H, Dohki S, Takiguchi M, Matano T: Involvement of multiple epitope-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vaccine-based control of simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J Virol*, 80:1949-1958, 2006.
50. Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI: Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science* , 283:80-83,1999.
51. Li S, Hill CP, Sundquist WI, Finch JT: Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature* , 407:409-413, 2000.

52. Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M: Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice. *Cell* , 131:70-79,2007.
53. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Sundquist WI: The structural biology of HIV assembly. *Curr Opin Struct Biol* 2008, 18:203-217, 2008.
54. Tsukamoto T, Takeda A, Yamamoto T, Yamamoto H, Kawada M, Matano T: Impact of cytotoxic-T-lymphocyte memory induction without virus-specific CD4+ T-Cell help on control of a simian immunodeficiency virus challenge in rhesus macaques. *J Virol*, 83:9339-9346, 2009.
55. Reicin A, Ohagen A, Yin L, Hoglund S, Goff S: The role of Gag in human immunodeficiency virus type 1 virion morphogenesis and early steps of the viral life cycle. *J Virol* 1996, 70:8645-8652, 1996.
56. Freed EO: HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* , 251:1-15, 1999.
57. Lanman J, Lam TT, Barnes S, Sakalian M, Emmett MR, Marshall AG, Prevelige PE Jr: Identification of novel interactions in HIV-1 capsid protein assembly by high-resolution mass spectrometry. *J Mol Biol*, 325:759-772, 2003.
58. Lanman J, Lam TT, Emmett MR, Marshall AG, Sakalian M, Prevelige PE: Key interactions in HIV-1 maturation identified by hydrogen-deuterium exchange. *Nat*

*Struct Mol Biol* , 11:676-677, 2004.

59. Byeon I-JL, Meng X, Jung J, Zhao G, Yang R, Ahn J, Shi J, Concel J, Aiken C, Zhang P, Gronenborn AM: Structural convergence between Cryo-EM and NMR reveals intersubunit interactions critical for HIV-1 capsid function. *Cell* , 139:780-790, 2009.
60. Forshey BM, von Schwedler U, Sundquist WI, Aiken C: Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol* , 76:5667-5677,2002.
61. Sundquist WI, Hill CP: How to assemble a capsid. *Cell* , 131:17-19, 2007.
62. Kiepiela P, Ngumbela K, Thobakgale C, Ramduth D, Honeyborne I, Moodley E, Reddy S, de Pierres C, Mncube Z, Mkhwanazi N, Bishop K, van der Stok M, Nair K, Khan N, Crawford H, Payne R, Leslie A, Prado J, Prendergast A, Frater J, McCarthy N, Brander C, Learn GH, Nickle D, Rousseau C, Coovadia H, Mullins JI, Heckerman D, Walker BD, Goulder P: CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat Med* , 13:46-53, 2007.
63. Sacha JB, Chung C, Rakasz EG, Spencer SP, Jonas AK, Bean AT, Lee W, Burwitz BJ, Stephany JJ, Loffredo JT, Allison DB, Adnan S, Hoji A, Wilson NA, Friedrich TC, Lifson JD, Yang OO, Watkins DI: Gag-specific CD8+ T lymphocytes recognize infected cells before AIDS-virus integration and viral protein expression.

*J Immunol*, 178:2746-2754, 2007.

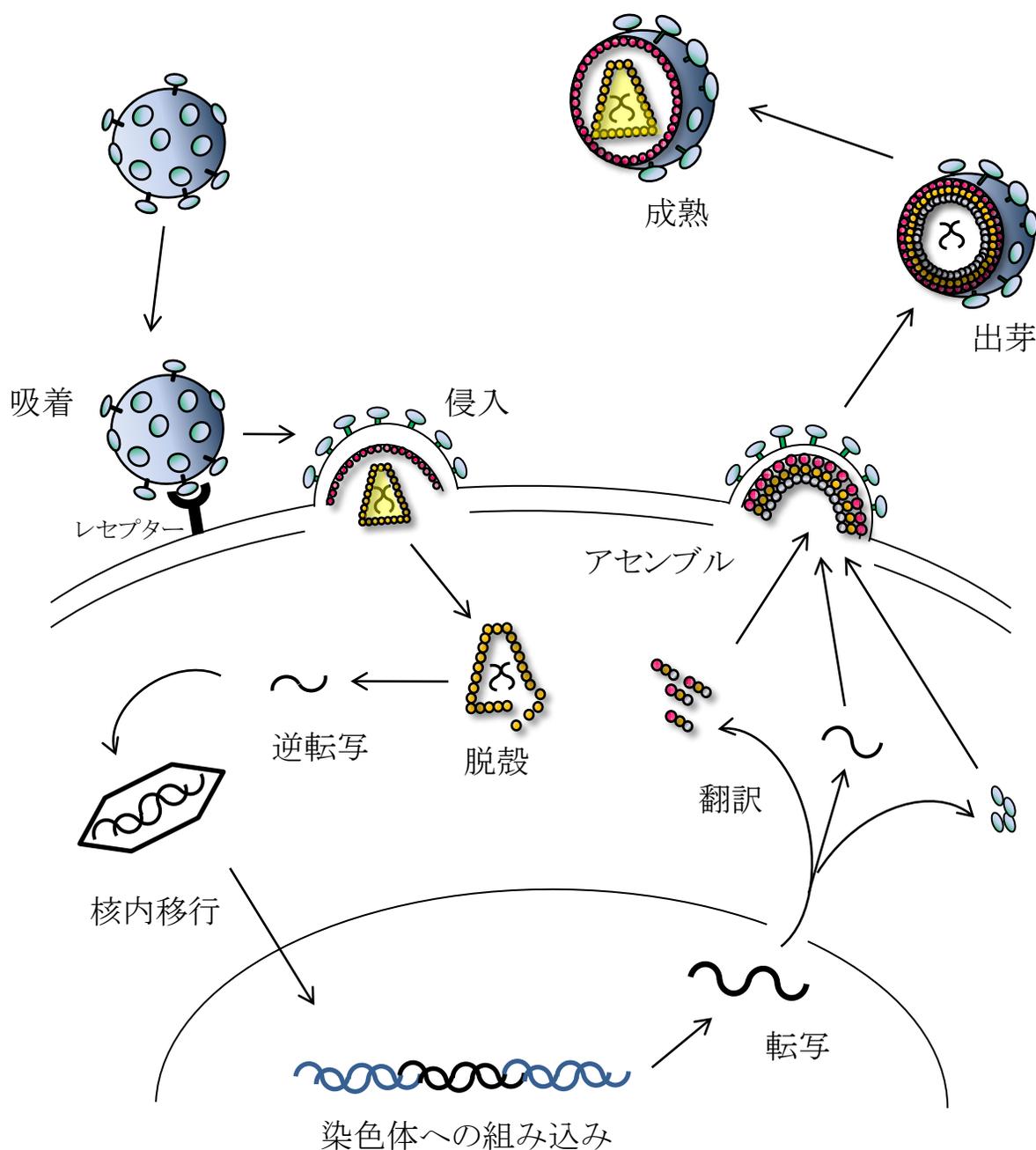
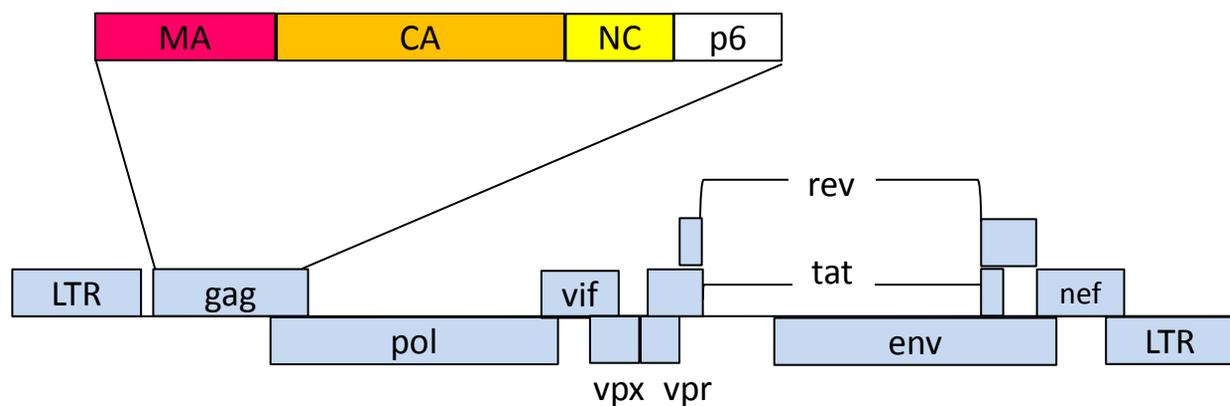


図1. HIV/SIV増殖過程

HIV/SIVが細胞に感染し増殖する過程は、CD4とcoreceptorを用いて細胞に吸着侵入し逆転写、核内移行、染色体の組み込みの後、プロウイルスから転写、翻訳を経て、タンパク質のアセンブル、出芽、成熟に区分される。

a.



b.

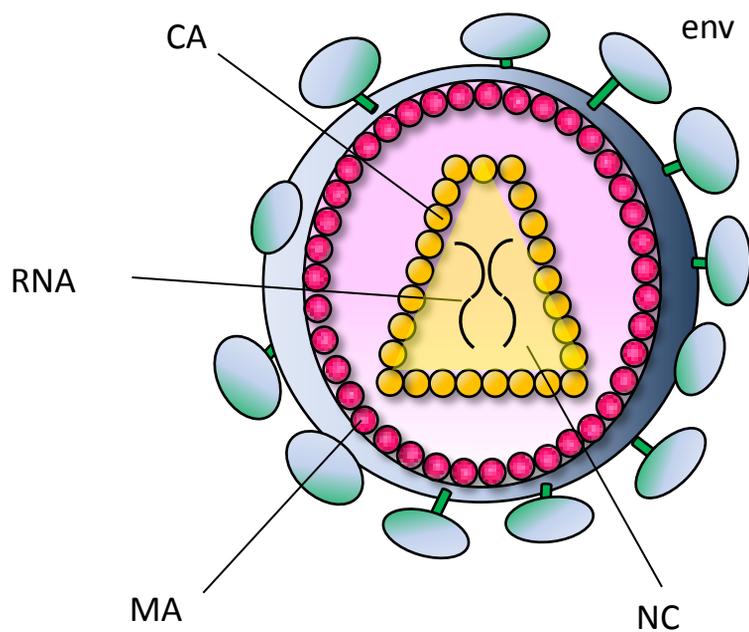


図2. SIVの遺伝子と粒子構造

SIV は、構造タンパク質のGag、Pol、Env、調節タンパク質のTat、Rev、そしてアクセサリータンパク質のVif、Vpr、Vpx、Nefで構成されている。Gagはプロセッシングを受け、さらにMA、CA、NC、p6が出来る。

a 遺伝子構造 (SIVmac)

b 粒子構造 (SIVmac)

a.

	140	150	160	170	180	190
SIVmac239	-----PVQQI	GGNYVHLP	PRTLNAWVKL	IEEKKFGEV	VPGFQALSEG	CTPYDINQML
SIVsmE543-3	-----V	-----	-----	V-----	-----	-----
	200	205 210	220	230	240	250
SIVmac239	NCVGDHQAAM	QIIRDIIINEE	AADWDIQHPQ	PAPQQ	GQLRE	PSGSDIAGTT
SIVsmE543-3	----E-----	----E-----	-----	-----G-LPA-----	-R-----	-T-E-----
	260	270	280	290	300	310
SIVmac239	YRQQNPIPVG	NIYRRWQLG	LQKCVRMYP	TNILDVKQGP	KEPFQSYVDR	FYKSLRAEQT
SIVsmE543-3	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	312 320	330	340	350	360	
SIVmac239	DAAVKNWMTQ	TLLIQNANPD	CKLVLKGLGV	NPTLEEMLTA	CQGVGGPGQK	ARLM
SIVsmE543-3	-P-----	-----	-----M	-----	---I-----	---

b.

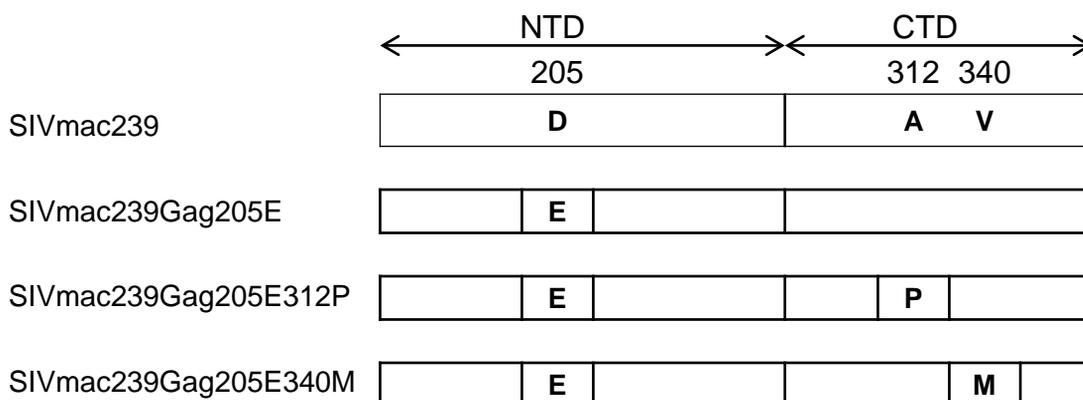


図3. SIVカプシドアミノ酸配列

- a. SIVmac239およびSIVsmE543-3のCAアミノ酸配列。CA (Gag領域の136-364)におけるSIVmac239 (上段)とSIVsmE543-4 (下段; Gene Bank accession No U72748)のアミノ酸相同配列。Gag136-283領域までがN末端ドメイン、Gag284-364領域がC末端ドメインであり、C末端ドメイン領域は青塗りで示した。CypA結合ループ (HIV-1からの予測)は緑塗りで示した。また Gag205, Gag312, Gag340番目の位置を赤字で、Gag<sub>206-216</sub>CTL誘導エピートプを四角で囲って表した。
- b. 作成したSIV CA変異体。SIVmac239Gag205E変異体は、SIVmac239のGag205番目のみをDからSIVsmE543-3由来のEに置換したものである。同様に、SIVmac239Gag205E312P変異体は、Gag205番目をDからEにGag312番目をAからPに置換したものの、SIVmac239Gag205E340M変異体は、Gag205番目をDからEにGag340番目をVからMに置換したものである。

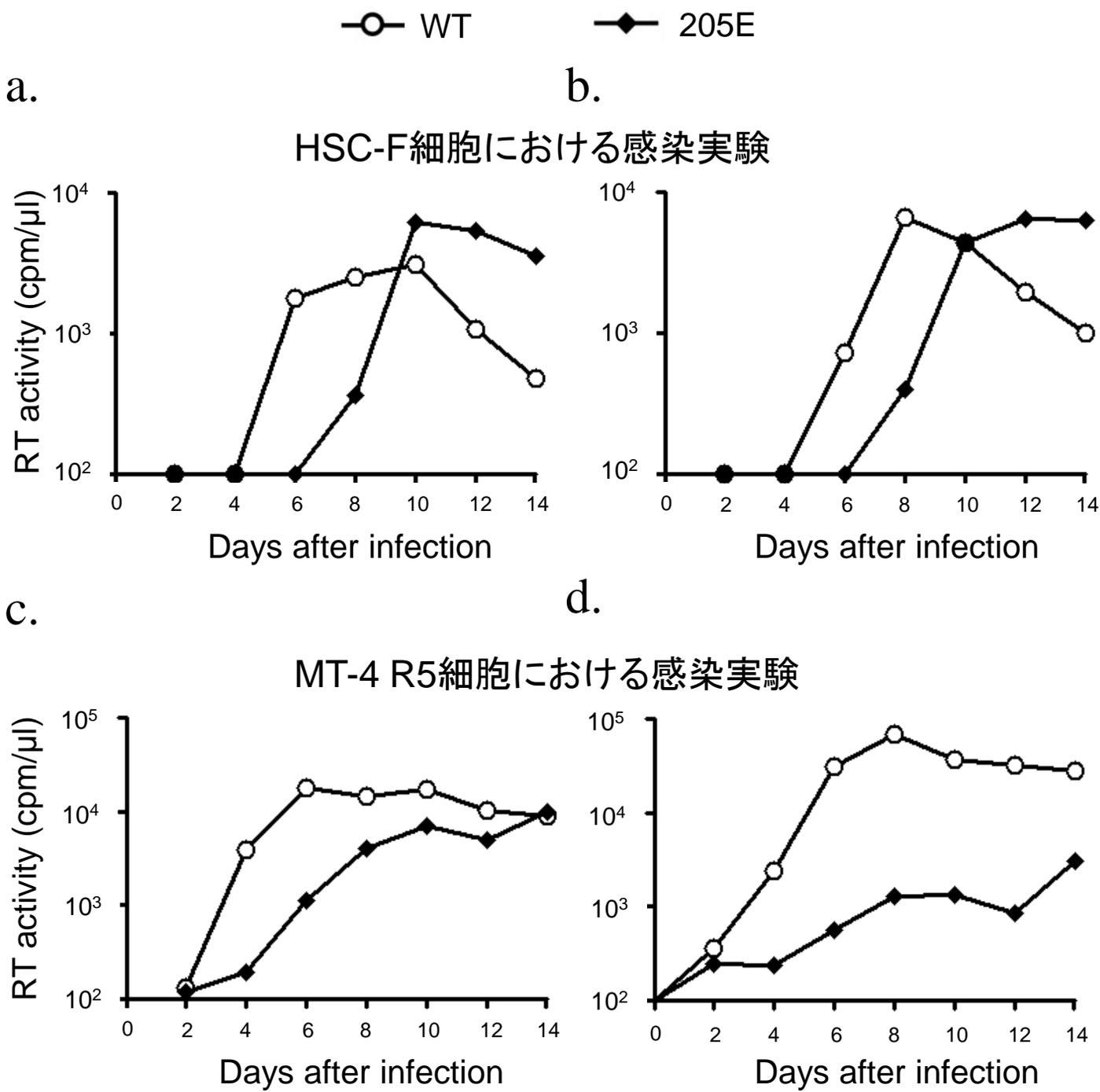


図4. SIVmac239 野生型とSIVmac239Gag205E変異体のサルT細胞株およびヒトT細胞株での感染実験

a. b. サルト細胞株であるHSC-F細胞にCOS-1細胞産生(右)ないしHeLa細胞産生(左)ウイルスを感染させ、培養上清をRT活性で測定した。SIVmac239WTを白マル(○)、SIVmac239Gag205E変異体を黒ダイヤ(◆)で示した。

c. d. ヒトT細胞株であるMT-4 R5細胞にCOS-1細胞産生(右)ないしHeLa細胞産生(左)ウイルスを感染させ、培養上清をRT活性で測定した。SIVmac239WTを白マル(○)、SIVmac239Gag205E変異体を黒ダイヤ(◆)で示した。

4回(a, b)あるいは2回(c, d)の実験結果のうち代表的なものを示す。

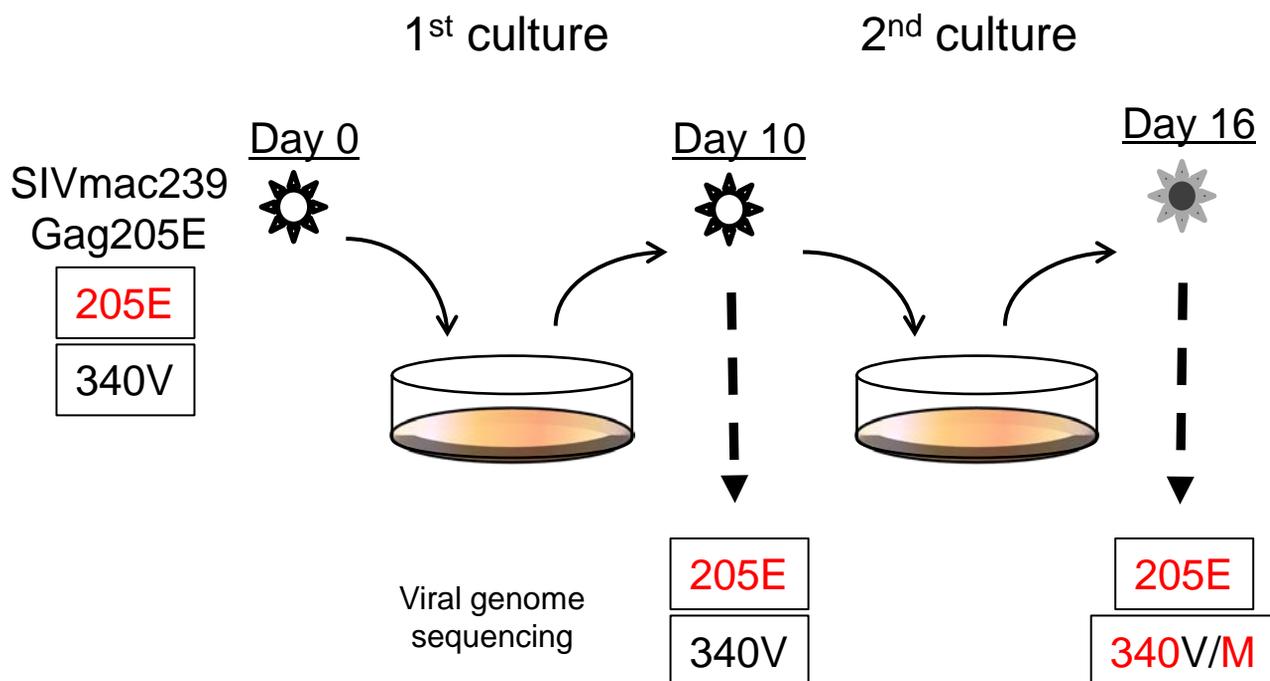


図5. SIVmac239Gag205E変異体のサルT細胞株での継代実験

SIVmac239Gag205E変異体をサルT細胞株HSC-F細胞に感染させ、感染10日目の培養上清を未感染のHSC-F細胞に感染させ、継代2代目とした。継代1代目の感染10日目および継代2代目の感染16日目の培養上清からウイルスRNAを抽出し、gag領域のシーケンスを行った。感染10日目では、感染スタート時より変化がなく、Gag205E以外は優位な変異は認められなかった。しかし、感染16日目にはGag205Eの変異は維持されたままで、新たにGag340番目に変異が加わりバリン(V)よりもメチオニン(M)が優勢になっていることが4試験中2試験で確認された。なおgagの他領域の変異は認められなかった。黒字はSIVmac239野生型のアミノ酸、赤字は変異したアミノ酸を表記した。

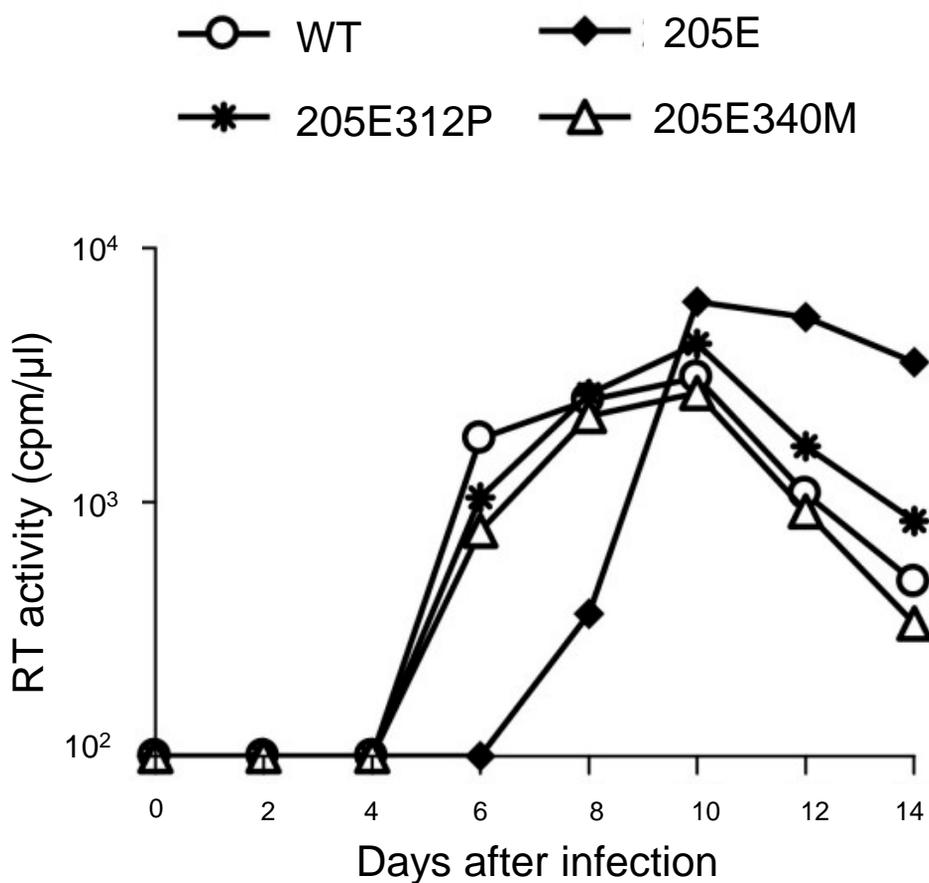
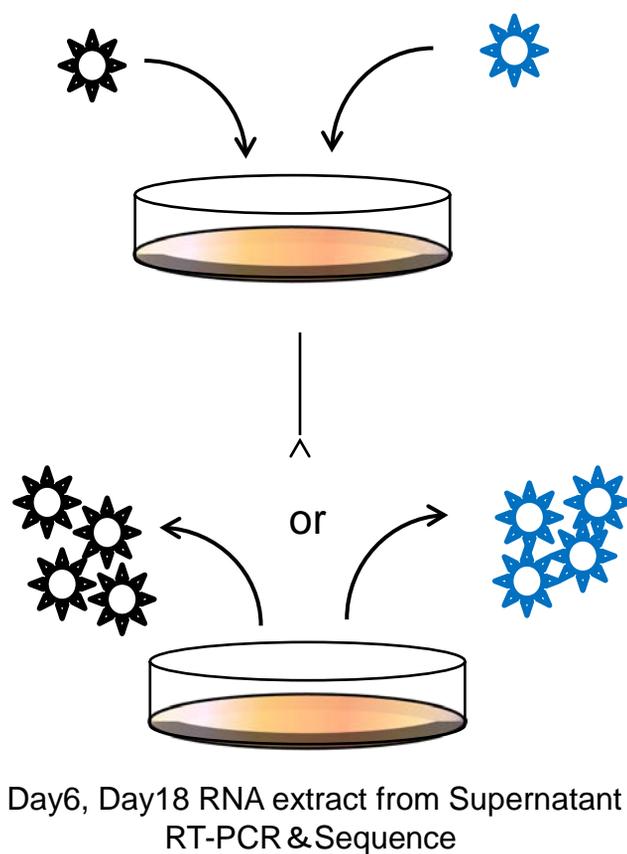


図6. SIVmac239Gag205E312PおよびSIVmac239Gag205E340M変異体のサルT細胞株での感染実験

サルT細胞株であるHSC-F細胞にCOS-1細胞産生ウイルスを感染させ、培養上清をRT活性で測定した。SIVmac239WTを白丸(○)、SIVmac239Gag205E変異体を黒ダイヤ(◆)、SIVmac239Gag205E312P変異体をアスタリスク(\*)、SIVmac239Gag205E340M変異体を白三角(△)で示した。4回の実験結果のうち代表的なものを示す。



**図7. Competition Assay**

変異ウイルス2種類について、RT活性比が4:1、1:1 ないし1:4に相当するウイルス量をHSC-F細胞に共感染させた。

Day6、Day18 の培養上清からウイルスRNAを抽出し、その配列を調べることによりドミナントになるウイルスを決定するアッセイ系。

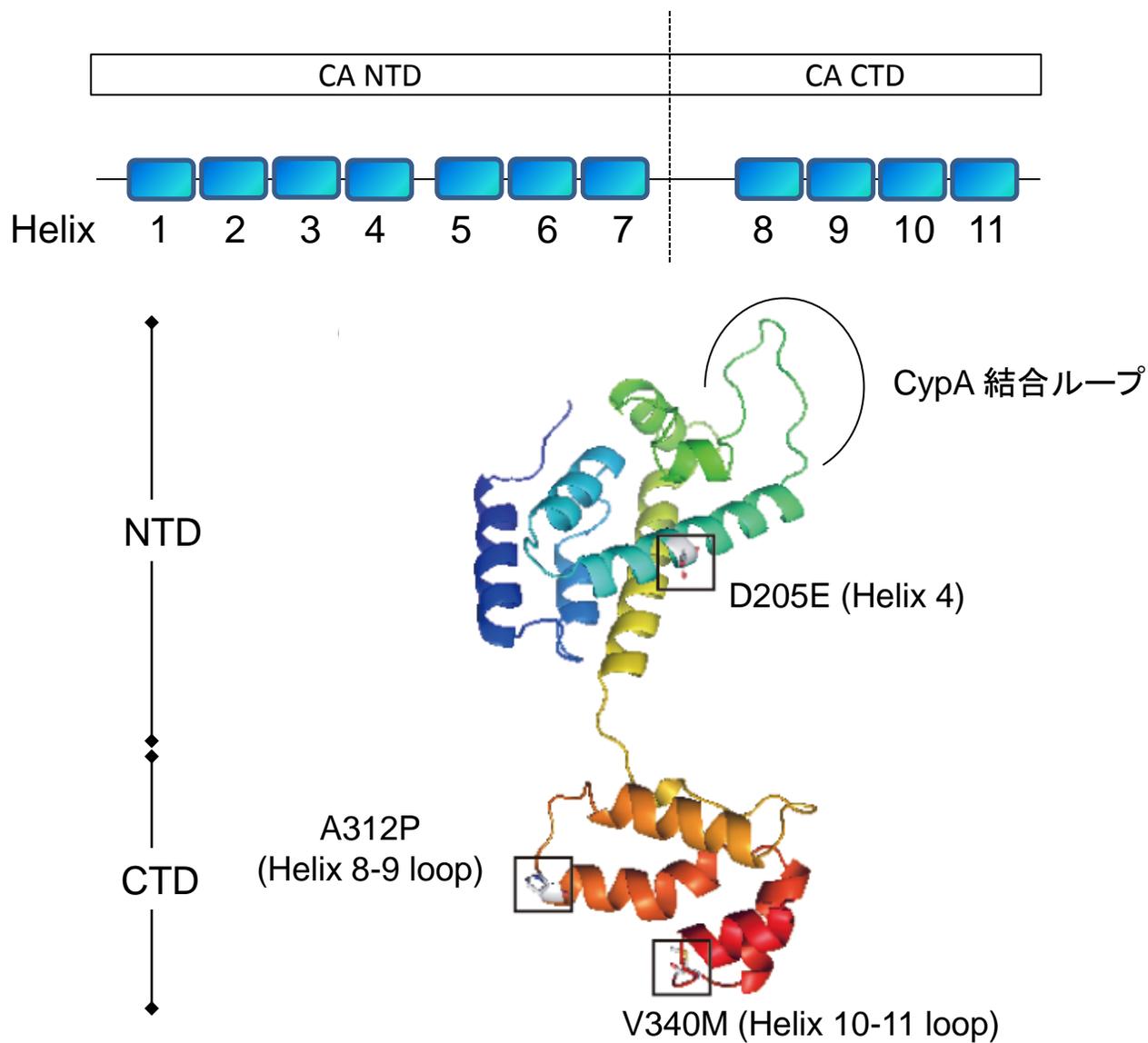
表1. SIV変異体におけるCompetition

SIVs in competition <sup>a</sup>	Ratio of inoc. titers <sup>b</sup>	Exp. no.	Dominant aa sequences <sup>c</sup>			
			day 6		day 18	
SIVmac239 & SIVmac239Gag205E	4:1	#1	205D		205D	
		#2	205D		205D	
	1:1	#1	205D		205D	
		#2	205D		205D	
	1:4	#1	205D		205D	
		#2	205D		205D	
SIVmac239 & SIVmac239Gag205E312P	4:1	#1	205D	312A	205D	312A
		#2	205D	312A	205D	312A
	1:1	#1	205D	312A	205D	312A
		#2	205D	312A	205D	312A
	1:4	#1	205D	312A	205D	312A
		#2	205D	312A	205D	312A
SIVmac239 & SIVmac239Gag205E340M	4:1	#1	205D	340V	205D	340V
		#2	205D	340V	205D	340V
	1:1	#1	205D/E	340V/M	205E	340M
		#2	205D/E	340V/M	205E	340M
	1:4	#1	205E	340M	205E	340M
		#2	205E	340M	205E	340M
SIVmac239Gag205E & SIVmac239Gag205E312P	4:1	#1	205E	312P	205E	312P
		#2	205E	312P	205E	312P
	1:1	#1	205E	312P	205E	312P
		#2	205E	312P	205E	312P
	1:4	#1	205E	312P	205E	312P
		#2	205E	312P	205E	312P
SIVmac239Gag205E & SIVmac239Gag205E340M	4:1	#1	205E	340M	205E	340M
		#2	205E	340M	205E	340M
	1:1	#1	205E	340M	205E	340M
		#2	205E	340M	205E	340M
	1:4	#1	205E	340M	205E	340M
		#2	205E	340M	205E	340M

<sup>a</sup> HSC-F細胞に2種類のSIVウイルスを共感染させた。感染6日目および18日目の培養上清からウイルスRNAを抽出し、RT-PCRによりgag領域を増幅した後シーケンスを行った。2試験行った結果(#1、#2)を各々示した。

<sup>b</sup> 感染時のRT活性ウイルス比。上段のウイルスRT活性:下段のウイルスRT活性の割合を表している。

<sup>c</sup> 感染時に変異が含まれていたアミノ酸部位において、優勢になっている残基を表記した。なお205D/EとはGag205番目アミノ酸がDとE同程度に検出されたことを、340V/MとはGag340番目アミノ酸においてVとMが同程度に検出されたことを示す。



**図8. SIVmac239 CA単量体モデル構造**

HIV-1のCA結晶構造を基に、SIVmac CAのモデリングを行った。

CA NTDは $\alpha$  Helix1-Helix7ならびにサイクロフィリン結合ループを含む。

CA CTDは $\alpha$  Helix8-Helix12そしてMHRを含んでいる。

SIVmac239 CA単量体において、D205EはNTDのHelix4、A312PはCTDのHelix8-9ループに、V340MはHelix10-11ループに位置する。

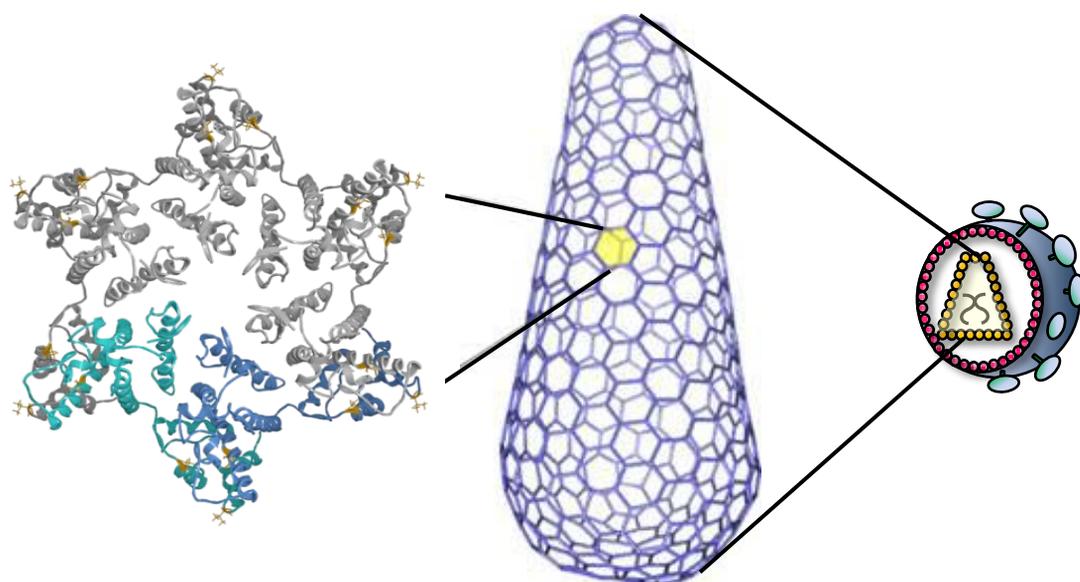


図9. HIV/SIV CAコア結晶構造

成熟ウイルス中のCAコアは主に六量体の集合体により円錐型構造をとる。

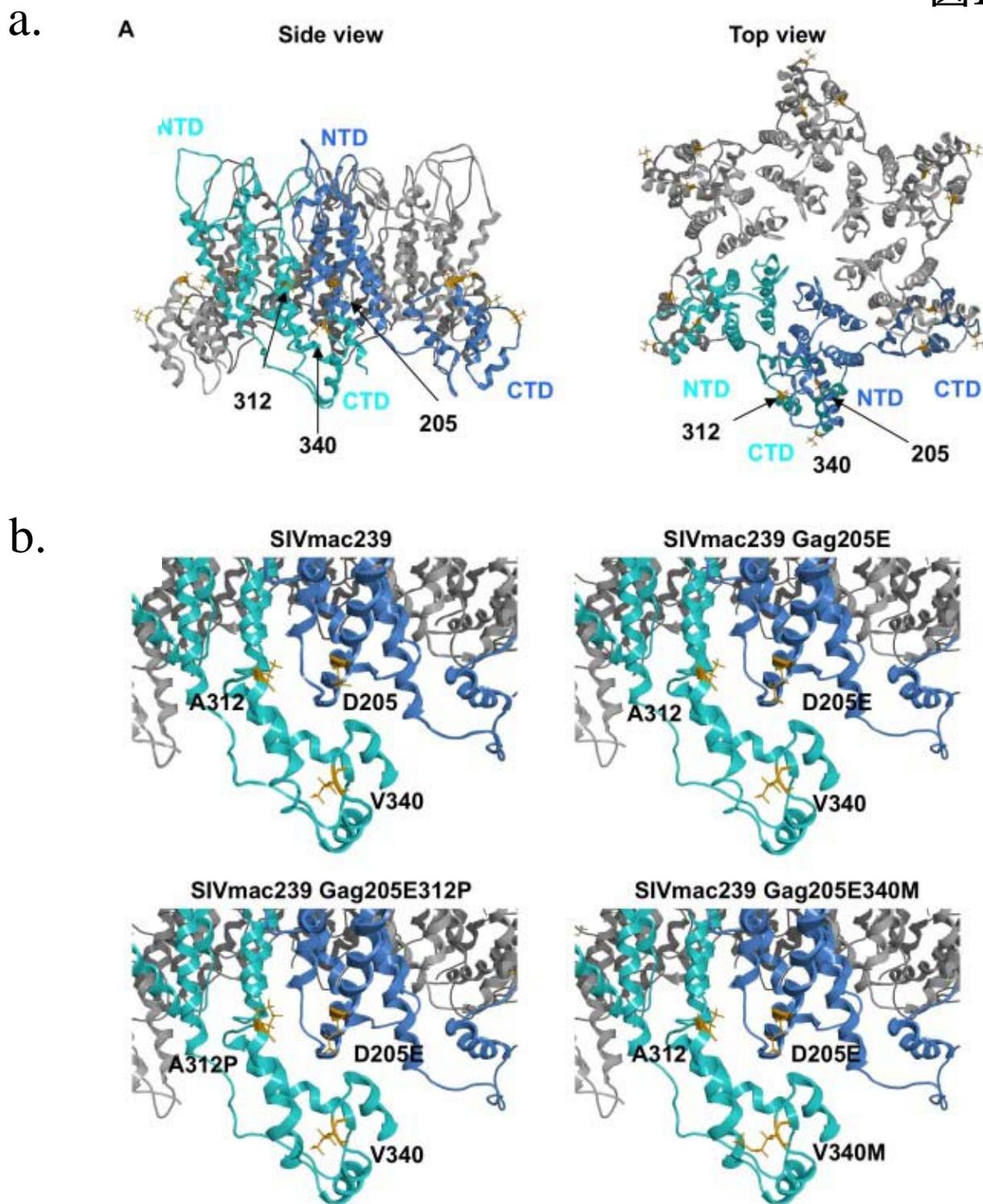


図10. SIVmac239 CA六量体の構造シミュレーション解析

HIV-1CA六量体結晶構造(1.90 Å, PDB code: 3H47)を基にホモロジーモデリングにより、SIVmac239CA六量体の構造シミュレーションを行った。モデリングの際、MOE version 2008.1002の MOE-Align およびMOE-Homology を用いた。Gag205, 312, 340番目の側鎖をオレンジで示した。

a. SIVmac239 CA六量体の全体図(Topおよびsideから見た図)。

b. Gag205,312,340番目付近のSIVmac239 CA六量体野生型および変異体の拡大図。

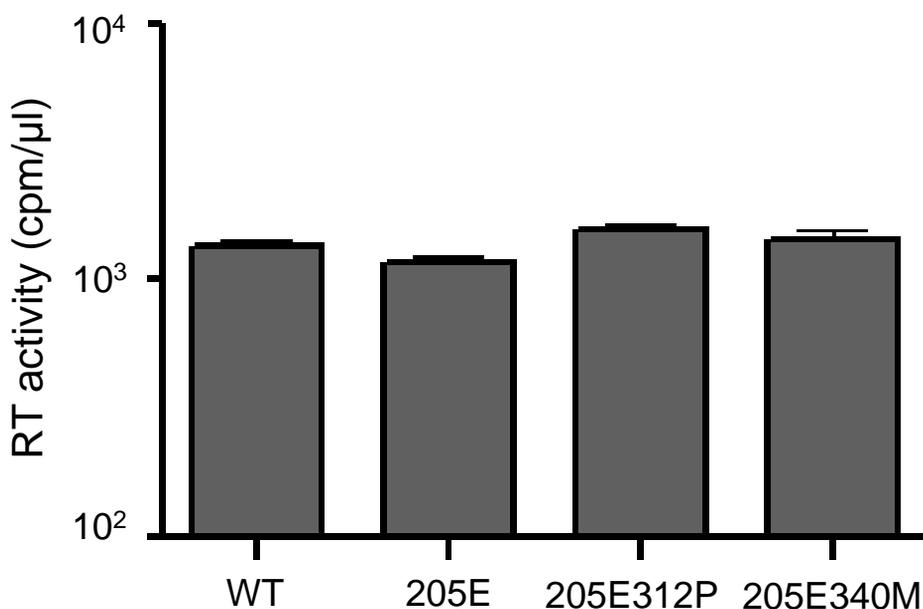
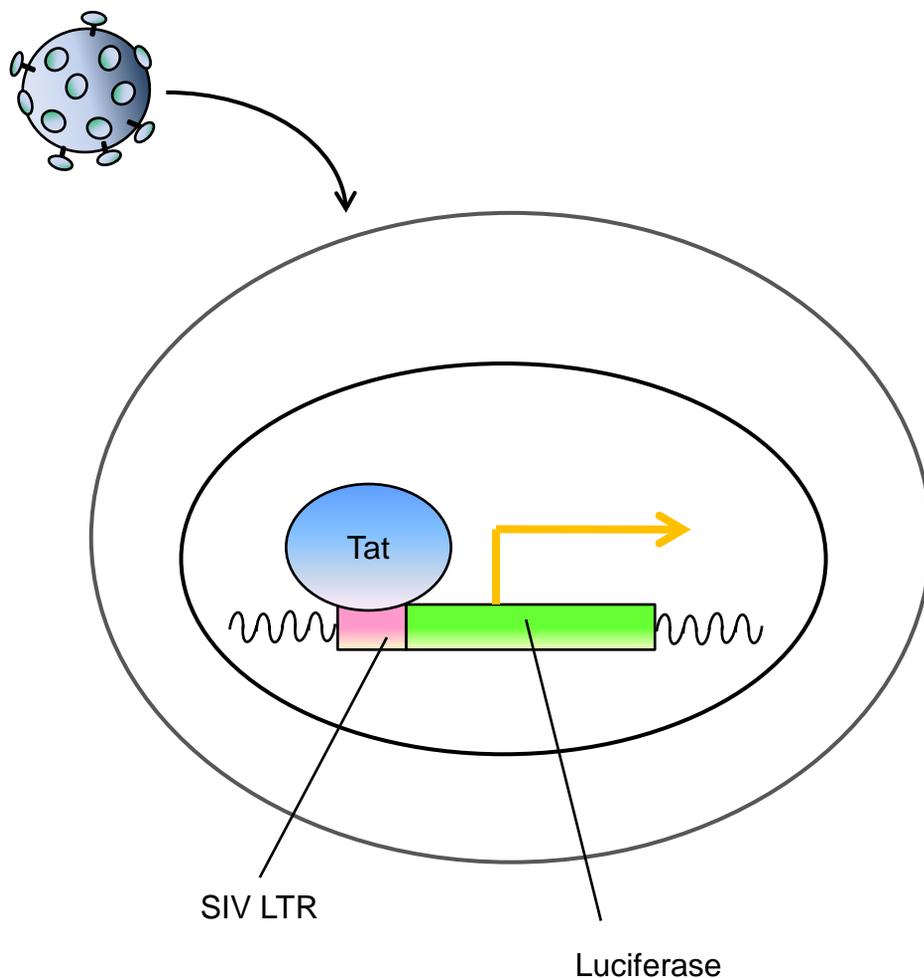


図11. ウイルスライフサイクル後期過程のスクリーニング

分子クローンDNA SIVmac239 野生型 (WT)、SIVmac239Gag205E (205E)、SIVmac239Gag205E312P (205E312P)、SIVmac239Gag205E340M (205E340M) DNAクローンを各々COS-1細胞に導入した。遺伝子導入48時間後の培養上清のRT活性を測定した。5回の結果の平均値を示した。



**図12. LuSIV細胞**

LuSIV細胞は、SIVmac239 Long Terminal Repeat (LTR) の下流にLuciferaseを組み込んだ遺伝子をヒトT細胞株CEMx174 細胞に導入した細胞。SIV感染後に発現するSIV由来のTat依存的にルシフェラーゼを発現発光する。

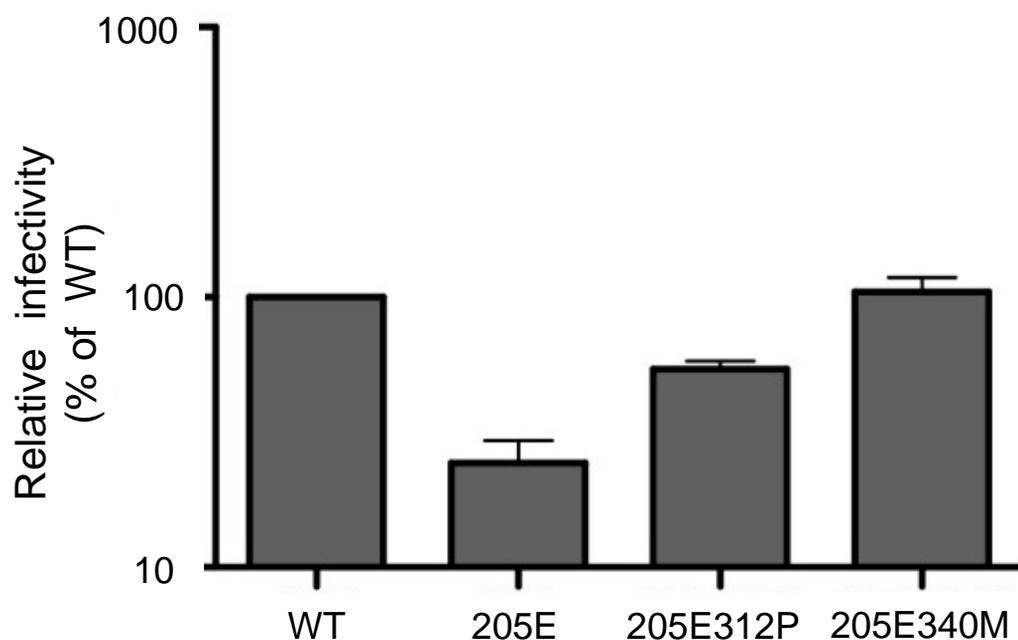
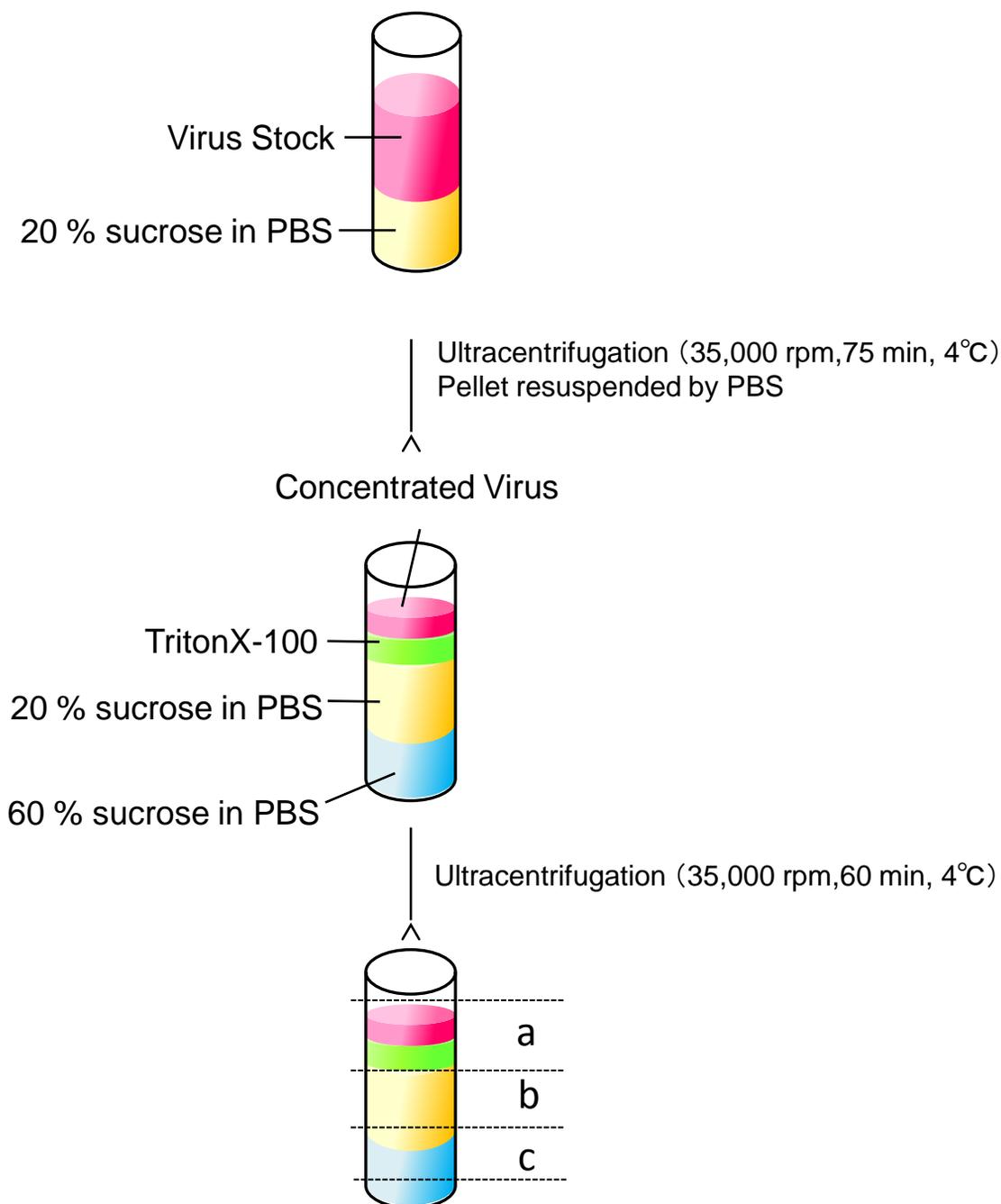


図13. ウイルスライフサイクル前期過程のスクリーニング

SIVmac239 野生型 (WT)、SIVmac239Gag205E (205E)、SIVmac239Gag205E312P (205E312P)、SIVmac239Gag205E340M (205E340M) を各々 LuSIV 細胞に感染させた。感染 24 時間後、ルシフェラーゼ活性を測定した。相対感染力は、SIVmac239 野生型のルシフェラーゼ活性に対する割合を表した。3 回行った結果の平均値を示した。

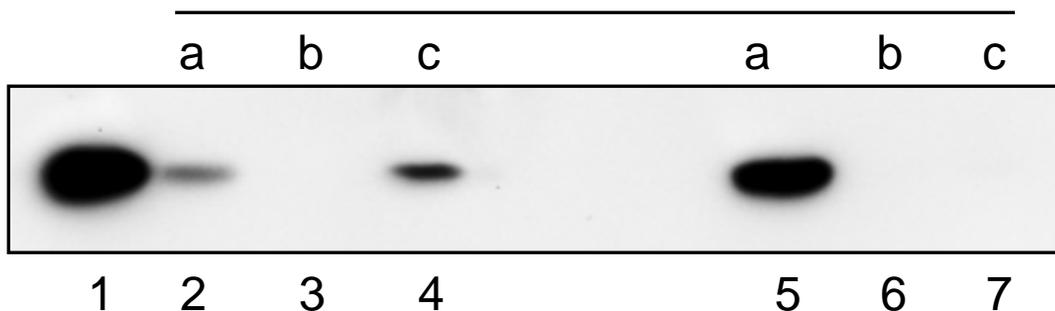


**図14 . In vitro core stability assay**

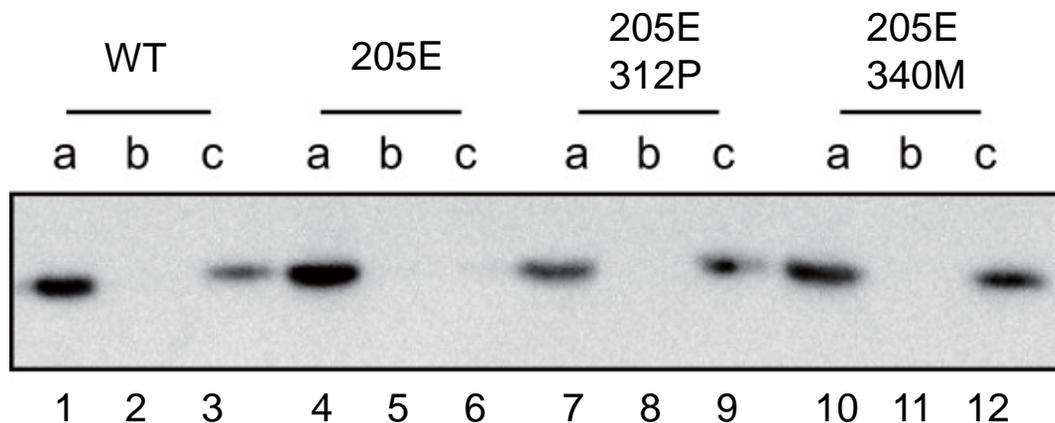
濃縮ウイルスを作成後、60%スクロース、20%スクロース、TritonX-100をのせた上に、濃縮ウイルスを重層し、超遠心を行った後、3分画に分けた。TritonX-100の濃度に応じて、濃縮ウイルスが分解され、分解されると超遠心後c分画まで到達せずにa分画に蓄積する。

WT

a.



b.



c.

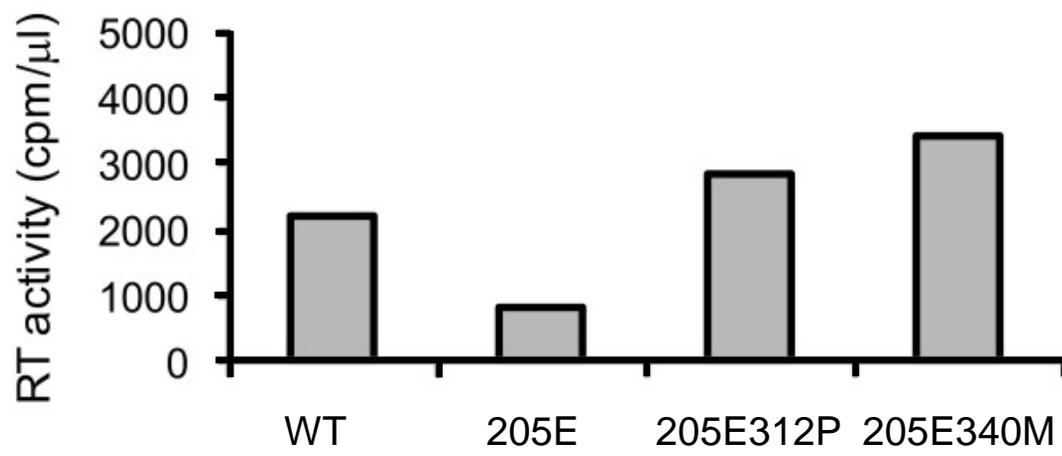


図15. SIV コア stability assay

- a. 濃縮ウイルスSIVmac239WT (レーン1)を、1%TritonX-100無(レーン2-4)有(レーン5-7)下で超遠心した後、三分画に分け回収、SIV CAp27タンパク質をウェスタンブロットティングにより検出した。
- b. 0.06%TritonX-100下で、濃縮ウイルスSIVmac239WT(レーン1-3)、SIVmac239Gag205E(レーン4-6)、SIVmac239Gag205E312P(レーン7- 9)、SIVmac239Gag205E340M(レーン10-12)を超遠心後、三分画に分け、SIV CAをウェスタンブロットティングにより検出した。
- c. bの全てのc分画に対し、RT活性を測定した。



図16. アカゲザルR01-007におけるSIVmac239チャレンジ後の血漿中ウイルス量 (ウイルスRNAコピー/mL)。  
血漿中ウイルス量が400コピー/mL未満を検出限界未満としている。

表2. SIVmac239WT感染アカゲザルR01-007<sup>a</sup>におけるウイルスGagシーケンス

Wks after challenge	Amino acid sequences <sup>b</sup>		
	at 205th	at 216th	at 340th
123	D	S	V
137	D (E)	S (L)	V (M)
150	E	L	M

<sup>a</sup> MHCハプロタイプ90-120-Ia-陽性マカクザルR01-007にSIVmac239WTを感染させ、感染慢性期123週, 137週, および150週の血漿からウイルスRNAを抽出した。このサルではGag<sub>206-216</sub>-特異的CTLからのエスケープ変異GagL216Sが優位であったが、137週目にはGag205E + Gag340M変異が認められ、150週目にはGagL216Sがほぼ完全に復帰変異し、このGag205E + Gag340Mが優位になった。

<sup>b</sup> Gag205,216,340番目で優位になっているアミノ酸を表記した。括弧内のアミノ酸は優位ではないが検出可能なアミノ酸を記載した。黒表記が野生型のアミノ酸を、赤表記が変異のアミノ酸を示す。

## 7 謝辞

---

本研究を行うにあたり御指導、御鞭撻を賜りました俣野哲朗東京大学医科学研究所教授に心より感謝を申し上げます。また、佐藤裕徳先生（国立感染症研究所ゲノム解析研究センター）、横山勝先生（国立感染症研究所ゲノム解析研究センター）には御協力と御助言を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

東京大学医科学研究所感染症国際研究センター、国立感染症研究所、医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、予防衛生協会の皆様をはじめ、多くの方々から御協力をいただきましたこと、そして常に支えてくれた家族に深謝申し上げます。