

HIV-1 インテグラーゼに対する単価抗体を、

V_{pr} を介してウイルス粒子に取り込ませることによる感染力抑制

奥井 伸 雄

①

HIV-1 インテグレースに対する単鎖抗体を、Vpr を介してウイルス粒子に取り込ませることによる感染力抑制

東京大学大学院 博士課程 外科学専攻

平成 7 年入学

奥井 伸雄

目次

要旨.....	4
背景と意義.....	7
HIV-1 の構造、遺伝子、増殖機構.....	7
AIDS と遺伝子治療.....	9
CTVI (capsid-targeted virion inactivation) 戦略.....	10
CTVI 戦略におけるキャリアーとしての Vpr	12
CTVI 戦略における抗ウイルス効果のある分子としての単鎖抗体.....	13
CTVI 戦略における単鎖抗体のターゲットとしてHIVIN	14
Vpr と scAb2-19 を融合して scAbE-Vpr* を作製する意義.....	15
材料と方法.....	17
細胞、抗体.....	17
プラスミドの精製と作製.....	18
DNA の導入.....	19
イムノプロット アッセイ.....	19
バインディング アッセイ.....	20

HIV ストック.....	21
RT アッセイ、 p24 アッセイ.....	22
MAGI アッセイ.....	22
PCR アッセイ.....	23
結果.....	24
実験の概要.....	24
融合蛋白質の発現.....	26
scAbE-Vpr* の HIVIN への結合能力.....	26
scAbE-Vpr* を取り込んだ HIV-1 のウイルス発生量の変化.....	26
scAbE-Vpr* を取り込んだ HIV-1 の感染能力.....	26
scAbE-Vpr* が HIV-1 粒子への取り込まれる能力.....	28
scAbE-Vpr* を取り込んだ HIV-1 はどのステップが抑制されているか.....	28
考察.....	30
Vpr* は、CTVI 戦略のキャリアーとして有用である。.....	31
単鎖抗体は、CTVI 戦略の抗ウイルス効果を持つ分子として有用である。	31

scAbE-Vpr* による感染力抑制の機序。.....	31
遺伝子治療における CTVI 戦略の将来性と scAbE-Vpr* での課題。.....	33
謝辞.....	35
文献.....	37
図説明.....	45
図.....	55

要旨

(背景と意義) 1 型 ヒト免疫不全ウイルス(human immunodeficiency virus type1: HIV-1) 粒子が形成される際に抗ウイルス効果のある分子を取り込ませる方法による新しい遺伝子治療戦略を CTVI (capsid-targeted virion inactivation) 戦略という。CTVI 戦略は、放出されるウイルスを標的とする点で、感染細胞や細胞内でのウイルス複製を標的とした従来の遺伝子治療と異なる。CTVI 戦略は、感染力のないウイルスを作ることが出来るため、HIV-1 感染症に対する治療として期待できる。本研究は、CTVI 戦略に有用な分子を開発することを目的とする。(材料と方法) 抗 HIV-1 インテグレース (HIVIN) 単鎖抗体 (Single-Chain Antibody clone 2-19: scAb2-19) を作製した。scAb2-19 の発現した細胞から放出される HIV-1 の粒子に scAb2-19 は取り込まれない。このため、ウイルス粒子に効率よく取り込まれる蛋白質である HIV-1 の Viral Protein R (Vpr) と scAb2-19 を融合させた scAbE-Vpr* を発現するプラスミドを作製した。ヒト 293T 細胞に、HIV-1 infectious clone pLAI と、scAb2-19 発現 DNA、scAbE-Vpr* 発現 DNA とを co-transfection し、それぞれの細胞から産生したウイルス、HIV-1 wild type、scAb2-19-virus、または scAbE-Vpr*-virus を回収した。各ウイルス量は、p24 アッセイと RT アッセイで測定し、感染力は、MAGI アッセイで測定した。各ウイルスの蛋白はイムノブロットにて解析した。scAbE-Vpr*-virus を感染させた CEM 細胞中の HIV-1 DNA を PCR を用いて検出した。(結果) ウイルスの産生量には、大きな違いはなかった。scAbE-Vpr*-virus の感染力は、完全に消失していたのに対して、scAb2-19-virus の感染力は、wild type の 1% 程度であった。scAbE-Vpr*-virus の

粒子中に scAbE-Vpr* は Vpr と同程度に取り込まれていたのに対して、scAb2-19-virus 中に scAb2-19 取り込まれていなかった。各ウイルス中のインテグラーゼの量は同じであった。scAbE-Vpr*-virus 感染後 4 時間目から HIV-1DNA が検出された。(考察) ウイルス粒子に取り込まれた scAbE-Vpr* がウイルス粒子内の HIVIN に作用して、感染後の逆転写されたウイルス DNA の組み込みを阻害し、ウイルスの感染力を抑制したものと思われる。他のウイルス特有酵素に対する単鎖抗体を用いた CTVI 用分子の開発も可能と考える。

背景と意義

後天性免疫不全症候群 (acquired immunodeficiency syndrome ; AIDS) は、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus type1: HIV-1) 感染症である(1、2、3、4、5、6)。HIV-1 に感染してからエイズの発症に至るまで数年から数十年の潜伏期間がある (5)。この間、感染者の体内ではウイルスの増殖と免疫系による感染細胞の破壊と浮遊ウイルス感染の中和の両面からダイナミックな平衡状態にある(2)。AIDS の発症するころになると、HIV 感染細胞とウイルスの量は急激に上昇し、その結果免疫不全をきたして、日和見感染などによって死亡する。したがって、AIDS の予防と治療は、HIV-1 の増殖をいかに抑えるかにかかっている。現在、HIV-1 感染症に対しては種々の治療法が研究されている。しかし、まだ決定的な治療法は開発されていない(2、7)。

HIV-1 感染症に対する治療の一つとして患者の細胞に外来の遺伝子を導入することにより治療する遺伝子治療は、ウイルスの増殖を抑制することができるため期待されている(1、2、7、8)。

HIV- 1 の構造、遺伝子、増殖機構

HIV-1 は、約 9.2kb の 1 本鎖 RNA をウイルスゲノムとして持ち、3 つの構造遺伝子 *gag*,

pol, *env* と少なくとも 6 つの調節遺伝子 (アクセサリー遺伝子) *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpr*, *vpu* を持つ。宿主の DNA に組み込まれたプロウイルスの形では、両端に長い反復配列である LTR (Terminal Repeat) を保有している (2, 3, 4, 5, 6)。

HIV-1 は、直径約 100nm のウイルスで、感染細胞から出芽する際に持ち出した細胞膜由来のエンベロープを持っている。最外層に細胞への感染の初期の段階に関与する *env* 遺伝子にコードされる糖蛋白質 gp120 があり、それと接して内側には同じく *env* 遺伝子にコードされる gp41 が非共有結合して膜に埋め込まれている。その内側には *gag* 遺伝子にコードされるマトリクス蛋白質 p17 (MA) があり、これがミステル化されることにより膜と強固に結合し、膜を安定化させている。核 (コア) は、*gag* 遺伝子にコードされるカプシド蛋白質 Capsid Protein p24 (CA) に包まれており、中に遺伝子として RNA と *pol* 遺伝子にコードされる酵素 (HIV-1 逆転写酵素 (reverse transcriptase (RT))、組み込み酵素 (HIV-1 インテグラーゼ (HIVIN)))、*gag* 遺伝子にコードされるヌクレオカプシド蛋白質 p7, p9 (NC) を含む (2, 3)。また、アクセサリー蛋白質の中では *vpr* 遺伝子にコードされる Viral Protein R (Vpr) が、粒子内に含まれる。他のアクセサリー遺伝子にコードされるアクセサリー蛋白質は、粒子内にあるかどうか不明である (2, 3)。

HIV-1 は、エンベロープの糖蛋白質とレセプターである CD4 分子との特異的相互作用により感染し、細胞内にてウイルス自身が有する RT により RNA が二本鎖 DNA へ転換され、宿主の染色体内へ組み込まれ、潜伏状態となる。ウイルス遺伝子がコードする蛋白質のうち調節遺伝子といわれる遺伝子がコードする Tat, Rev が最初に合成され、Tat と Rev の作用により、

mRNA のスプライシングや細胞質への輸送が行われ、ウイルスの構造蛋白質が合成される(2、3、4、5、6)。合成されたウイルスの蛋白質は、種類の修飾を受けた後、細胞膜表面に集合する。これに2分子のRNAがウイルスゲノムとして取り込まれ、出芽によってウイルス粒子として放出される(3、4)。

AIDS と遺伝子治療

AIDS の遺伝子治療は、(a) HIV-1 の増殖を特異的に抑制する蛋白質、またはRNAをコードする遺伝子(抗 HIV-1 遺伝子)を導入して、リンパ球を HIV-1 抵抗性に変えようとする方法(細胞内免疫; intracellular immunization)、(b) HIV-1 の感染した細胞を特異的に殺す方法、(c) HIV-1 蛋白質を生体内で発現させワクチン効果を得ようとする方法などがあげられる(3、7)。(a)の方法には、アンチセンスによる戦略、リボザイムによる戦略、デコイによる戦略、Trans dominant mutant による戦略があげられる。(b)の方法には、感染細胞の除去による戦略、(c)の方法には、ワクチンによる戦略があげられる(3、7)。

アンチセンスとは mRNA に相補的な配列の DNA または RNA のことで、細胞内で mRNA と部分的二重鎖をつくることにより遺伝情報の発現を抑制すると考えられている。リボザイムは、酵素活性を持つ RNA 分子で、相補的に標的 RNA に特異的に結合し、その特定の部位で RNA を切断することによりその RNA を不活性化する。デコイ戦略は、トランス活性化物質とシス活性化分子を、競合核酸分子(デコイ)によって、競合阻害しようとする考え方である。Trans dominant mutant とは、ウイルス蛋白質の mutant を細胞内に結合させて、正常蛋白

質の活性を競合阻害させてウイルスの産生を阻止するものである(2、3、7)。

感染細胞の除去に用いられる手段として、自殺遺伝子を細胞に導入する方法が取られる。自殺遺伝子には、ジフテリア毒素A鎖、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子があげられる(3、7)。

遺伝子ワクチンは、HIV-1をコードする遺伝子を細胞内に導入し、細胞内で合成されたHIV-1抗原ペプチドをMHCクラスI抗原提示系に導入して、CD8陽性T細胞を介したHIV-1特異的な免疫応答を得ることである(7)。

これら遺伝子治療は、さまざまな研究がなされているが、解決すべき問題は多い。多くの研究にて短期間にウイルスの抑制は可能であるが、長期にわたる実験ではウイルスは一貫として抑制を逃れてしまうことである。また、研究に使用された細胞のほとんどは培養細胞であり、生体内のリンパ球での効果は不明である(7)。

CTVI (capsid-targeted viral inactivation) 戦略

従来のHIV-1感染症に対する遺伝子治療研究では、細胞内でのウイルスの増殖の阻害を目的としたものや、感染細胞を死滅させることを目的としたものであり、出芽してしまったウイルスに対しての遺伝子治療はほとんど研究されていない(1)。ウイルス粒子形成時に取り込まれる分子が開発できれば、ウイルスの成熟を阻害したり、感染力のない粒子を産生させることが可能となり、新しいHIV-1感染症に対する遺伝子治療となりうる(1)。

ウイルス粒子が形成される際に抗ウイルス効果のある分子を取り込ませる方法による新し

い遺伝子治療戦略を一般的に CTVI (capsid-targeted viral inactivation) 戦略という(Fig.1, 1, 9, 10, 11, 12)。CTVI 戦略は、1991 年に Boeke らにより始めて提唱され、この名称がついた。Virion targeting viral inactivation (VTVI)戦略、または destroying retroviruses from within と称される。しかし、本研究のようにウイルスを内部から破壊するものもあるので、コ・パッケージング戦略と称することもできると考える(13)。CTVI 戦略は、放出されるウイルスを標的とする点で、感染細胞や細胞内でのウイルス複製を標的とした従来の遺伝子治療と異なる(1, 14, 15, 16)。CTVI 戦略には、ウイルス粒子に高い効率にとりこまれ、かつ抗ウイルス効果を持つ分子の開発が必須である(1, 11, 14, 15, 16, 17, 18, 19)。用いられる典型的な分子は、ウイルス粒子に高い効率に取り込まれる蛋白質と、抗ウイルス効果のある蛋白質の融合蛋白質である(1, 9)。ウイルス粒子に高い効率に取り込まれる分子(キャリアー)としては、CA (1, 5, 6)または Vpr (4, 14, 20, 21, 22, 23, 24)が用いられてきた。最初の提唱されたモデルでは、CA にウイルス RNA を分解する目的で RNase を融合させ、CA-RNase 融合蛋白質をウイルス形成時にとりこませた(Fig.1A, 1)。このことにより一部のウイルスは内部からウイルスの RNA を破壊することに成功した。この発表後、抗ウイルス効果のある分子には、CA に融合させて抗ウイルス効果を発揮する蛋白質として、ウイルスの内部構造を破壊するような酵素である *Staphylococcus nuclease* (SN) (24)、*Escherichia coli* RNase HI(25)が使われた。しかし、これらの融合蛋白質は、取り込み効率などの問題があり、ウイルスの感染力を 10 分の 1 程度に抑えるものでしかなかった。また、Vpr に融合させた抗ウイルス効果のある蛋白質として、SN (24)、HIV-2 プロテアーゼ(26)、chloramphenicol

acetyltransferase (27)、RT (28)、HIVIN(19、28、29)、oligopeptides (23)が用いられた (Fig.1B)。ウイルス粒子の内部にある RNA や蛋白質を破壊したり、内部が成熟する際に酵素が過剰に存在することにより成熟異常をおこすことを目的とした。Gag⁵²⁴ と Gag⁵² を切断する oligopeptides 24/2 を融合した合成ペプチド Vpr-24/2 は、感染力を 1000 分の 1 の抑制効果を呈した(23)。しかし、他の分子は 10 分の 1 程度の感染抑制効果であった。

CTVI 戦略におけるキャリアーとしての Vpr

本研究では、高い効率に取り込む分子として Vpr を用いた (Fig.1C)。その理由は、高い効率でウイルス粒子に取り込まれるからである。

Vpr は、100 アミノ酸程度 (11-16kDa) の大きさの蛋白質である(4、20)。その役割は諸説あり今後とも検討が必要である。マクロファージにおいてウイルスの複製の初期過程にてウイルス DNA を核移行させる働き(4、20)、転写活性因子としての働き(11)などがあるといわれる。細胞周期を G2 期で停止させる働き(G2 arrest)があるが、G2 arrest がウイルスの複製にどのように働くかは不明である (8)。ウイルス粒子を形成する Gag と 1 対 1 で結合してウイルス粒子形成時に大量に取り込まれる (10、11、20、23)。従って、取り込まれるコピー数は、Gag がウイルス粒子に 2000 コピー入るのに対して、Vpr は同程度である(10、11、20、25、30、31)。また、大きな分子を融合蛋白質として取り込むことも可能である(23、24、32)。ウイルス粒子に CTVI 戦略のキャリアーとして取り込ませるには、極めて効率の良い蛋白質である。CTVI 戦略に使う分子としての問題点は、Vpr による G2 arrest (20、21、33、34)

が挙げられる。この問題点については、Vpr は C 末端に分子をつけると G2 arrest を起こさないとされる(23)ため、本研究では Vpr の C 末端に influenza virus hemagglutinin tag (HA-tag) を付けた Vpr*とした。

CTVI 戦略における抗ウイルス効果のある分子としての単鎖抗体

本研究では、抗ウイルス分子として、scAb2-19 (35, 36)を用いた。scAb2-19 は、HIVIN に対する IgG 抗体(Fig.2A)の可変領域を融合して作製した単鎖抗体である。単鎖抗体を用いた理由は、単鎖抗体が単一のポリペプチドであることと分子量が比較的小さいことである。IgG 抗体が、150kDa の大きな分子であるのに対して、単鎖抗体は、31kDa の分子である。また、CTVI 戦略に単鎖抗体を用いた例はまだない。

単鎖抗体 (Fig.2B)とは、遺伝子組み換え技術を利用して、IgG 抗体の抗原に結合する部分である V_L と V_H とを 15 アミノ酸程度の長さのリンカーと呼ぶペプチドで結合させて、特異的に抗原に結合する性質を有する蛋白質のことである。単鎖抗体 (single-chain antibody, scAb, sAb)、単鎖抗原結合蛋白質 (single-chain antigen-binding peptide)、または、単鎖可変断片 (single-chain variable fragment, scFv, sFv) と呼ばれる。単鎖抗体の利点は、単一のポリペプチドであることを生かし、遺伝子として細胞に導入することが簡単にできることである。大腸菌にも導入し、大量に精製することも可能である。また、単鎖抗体の欠点は、一般に IgG 抗体に比べて抗原との結合能力が弱いことである。

CTVI 戦略における単鎖抗体のターゲットとしての HIVIN

HIVIN をターゲットとした理由は、HIVIN が HIV-1 の複製に必須で HIV-1 に特有な酵素であるからである。

HIV-1 は、細胞に侵入した後ウイルス内部からウイルス RNA を放出する。RNA が DNA に逆転写された後、現在報告されている限りではマトリックス、ヌクレオカプシド、RT、Vpr とともに preintegration complex(PIC)を形成する。次に宿主の DNA にウイルス DNA が組み込まれる。これをインテグレーションという (37)。インテグレーションは、LTR 領域の両 3' 末端の 2 ヌクレオチドを切断する 3' プロセッシング反応、宿主 DNA を 5' 端で切断して宿主 DNA とウイルス DNA が結合するジョイニング反応、ウイルス DNA の結合後一本鎖になった部分の相補鎖を作る修復反応の 3 つのステップからなる。この 3 つのうち HIVIN は、3' プロセッシング反応とジョイニング反応に触媒として働く (37)。

HIVIN は、全長 288 アミノ酸であり、3 つのドメインで構成される (37, 38, 39)。1 番から 50 番までの領域を Zn^{2+} フィンガー様ドメイン、50 番から 212 番までの領域を酵素活性ドメイン、213 番から 288 番までの領域を DNA 結合ドメインと言う。 Zn^{2+} フィンガー様ドメインは、ウイルス粒子形成における蛋白蛋白間相互作用に関与しているという説 (40) があり、この領域に含まれる HHCC モチーフと言う特定領域が重要で、このモチーフに点変異を導入すると逆転写以前のステップが抑制され (41)、他のレトロウイルスの HHCC モチーフに置き換えることも出来ない (42)。酵素活性ドメインは、 Mg^{2+} または Mn^{2+} と結合する (43, 44)。DNA 結合ドメインは、前者 2 つと比較してレトロウイルス間で多様性に富んでいる (45, 46, 47)。

この DNA 結合ドメインにより、IN 多量体形成及び核移行の機能が報告されている (37)。

我々の用いた scAb2-19 は、HIVIN の 228 番から 235 番までの領域に特異的に結合する(35、48)。従って、scAb2-19 が PIC の中で HIVIN に結合することで、HIVIN の DNA 結合能に影響を与えることもあり得る。HIVIN そのものの立体構造や PIC の立体構造を変化させることもありうる (46)。HIVIN が細胞性因子である importin α と結合してこの PIC の核移行を助けていることが報告されている(49)。scAb2-19 は、この importin α と結合による核移行に影響する可能性もある。

Vpr と scAb2-19 を融合して scAbE-Vpr* を作製する意義

scAb2-19 は、HIVIN に強く結合した (35)。scAb2-19 が細胞内で安定して発現する系を樹立できた(35)。scAb2-19 が発現している細胞に HIV-1 を感染させると、ウイルスは発生しなかった(35)。従って、scAb2-19 を CTVI 戦略に使う分子として、大量にウイルス粒子に取り込ませることは意義がある。

scAb2-19 と Vpr を融合させた分子 scAbE-Vpr*は、この分子は、ウイルス粒子に高い効率に取り込まれることが予想される (Fig.1C)。

さらに、HIVIN はウイルス特有の酵素で宿主細胞にはない為、scAb2-19 は、インテグレーションを抑制することで HIV-1 の感染抑制効果をもたらす。しかし、安定して発現する細胞が取れることから、宿主細胞の増殖に影響をおよぼさない(35)。従って、scAbE-Vpr*は、宿主細胞にとって安全な分子になると期待できる。

本研究では、CTVI 戦略に有用な分子として、HIV-1 に特異的な酵素に対する抗体を、Vpr と融合させて取り込むことにより、理想的な分子を開発し、CTVI 戦略が有用な遺伝子治療であることを示す。

材料と方法

細胞、抗体

293T 細胞(17)は、ヒト胎児腎由来細胞 293 細胞 (17) に SV40 の T 抗原を導入して樹立した細胞である。この細胞に今回用いた pCxN₂KS (Fig.3)(50)のような SV40 の ori を含む DNA を導入すると、細胞内の T と導入した DNA の SV40 ori との結合により、導入した DNA のコピー数が増える特徴がある。293T 細胞は、10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium: DMEM10) (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD) で、5%CO₂ の条件で 37℃インキュベーターにて培養した (51, 52)。HeLa-CD4-LTR/β-gal(MAGI) 細胞 (53) は、G418 200μg/ml と hygromycinB 100μg/ml を含む DMEM10 にて培養した。CEM 細胞 (54) は、ヒト T リンパ球由来の細胞で、HIV-1 が感染することができる (6)。CEM 細胞は、10%ウシ胎児血清を含む RPMI1640 (RPMI10) (Life Technologies Inc.) で、5%CO₂ の条件で 37℃インキュベーターにて培養した (55)。

抗体は、HA-tag に対するモノクローナル抗体 (抗 HA 抗体、rat, clone 3F10, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany)、抗 E-tag モノクローナル抗体 (抗 E-tag 抗体、mouse, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)、HIV-1 インテグラーゼに対するモノクローナル抗体 (11)、HIV-1 逆転写酵素 (p66/p51) に対するモノクローナル抗体 (抗 RT (p66/p51) 抗体、mouse, Advanced Biotechnologies, NC)、及び horseradish peroxidase (HRP) 標識された rat IgG 又は mouse

IgG に対するポリクローナル抗体 (Organon Teknika, Cappel Division, Durham, NC) を使用した。HRP は、ペルオキシダーゼの一種で、一般的に使われる安定した標識酵素であり、上記抗 HA 抗体と抗 E-tag 抗体に対する HRP 標識抗体が存在するため、本研究にて採用した。

プラスミドの精製と作製

HIV-1 infectious clone pLAI (55) と他のプラスミドは、大腸菌 DH5 α (Life Technologies Inc.) または Sure II (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて精製した。この 2 つの大腸菌では、プラスミド DNA に変異がはいることなく安定して回収できるため採用した (52, 56)。

アミノ酸 (YPYDVPDYA) からなる HA-tag をコードする 2 本鎖のオリゴヌクレオチド (57) は、2 つのオリゴヌクレオチド (5' -TCGAGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGC-3' と 5' -CGAGCTAATCTGGAACATCGTATGGGTAC -3') をハイブリダイズさせて作製した。この結果作製されたリンカーを pBluescript II KS(-) (Stratagene) の *Cla* I と *Xho* I 部位に挿入 (57) して、pBS-HA を作製した。HIV-1 *vpr* 遺伝子は、5' -

GAGGTACCATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAG-3' と 5' -

GACTCGAGGATCTACTACTGGCTCCATTTC-3' をプライマーとして、pLAI より ExTaq (宝酒造) を用いて タカラ PCR サーマルサイクラー TP2000 (宝酒造) にて、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法により得られた。この PCR 産物を、pBS-HA の *Kpn* I と *Xho* I 部位に挿入した。この結果得られたプラスミド pBS-*vpr* は、*vpr* と HA-tag をコードする遺伝子が結合した配列 (*vpr*-HA) を持つ。pBS-*vpr* から *vpr*-HA を *Kpn* I と *Sac* I で切り出し、動物細胞での

発現ベクター pC_XN₂KS (Fig.3, 48) に挿入した (52)。この結果得られたプラスミドを pC-Vpr* とした。

pC-scAb2-19 は、抗 HIVIN 単鎖抗体の C 末端に E-tag を融合したものが発現される (35)。

pC-scAb2-19NLS は、pC-scAb2-19 で発現される蛋白質の末端に核移行シグナル (LEPPKKRKRV) が融合したものである(35)。pBS-*vpr* から *vpr*-HA を切り出し、pC-scAb2-19 の E-tag の末端部位に挿入したものを、pC-scAbE-Vpr* とした。これは、scAb2-19 に Vpr の C 末端に HA-tag を融合したものが融合して発現する。pC-E7E-Vpr* は、pC-scAbE-Vpr* と全く同じ方法でパピローマウイルスの E7 に対する単鎖抗体の C 末端に E-tag を融合したものに Vpr の C 末端に HA-tag を融合したものが融合して発現する。

DNA の導入

これら融合蛋白質を発現するために 293T 細胞に、プラスミド DNA を、CellPhect Kit (Pharmacia Biotech AB) と CalPhos Maximizer (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) を用いて CalPhos Maximizer のプロトコールに従いリン酸カルシウム法 (52, 57) にて transfection した。DNA とリン酸カルシウムでできた沈殿を 293T 細胞に投与してから 48 時間後に細胞を回収して、RIPA バッファー (150mM 1%NP-40, 0.5%sodium deoxycholate, 0.1%sodium sulfate(SDS), 50mM Tris-HCl(pH8.0)) (52) に溶解した。

イムノブロット アッセイ

蛋白質のサンプルは、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Sodium Lauryl Sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)) (52) にて分離し、ニトロセルロース膜 (Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell Germany) にトランスファーをした。ニトロセルロース膜は、ブロックエース (雪印乳業) につけて1時間室温にて放置した後、抗 HA 抗体、抗 E-tag 抗体、抗 RT 抗体、または抗 IN 抗体の1次抗体入りの10%ブロックエースにつけて1時間室温にてインキュベートした。さらに、このニトロセルロース膜をブロックエースにて洗浄した後、HRP 標識したそれぞれの1次抗体に対する2次抗体入りの10%ブロックエースにつけて30分間室温にてインキュベートした。再び洗浄後、HRP 標識した2次抗体を ECLplus (Amersham International plc, Buckinghamshire, UK) で発光させ、X線フィルム (Hyperfilm ECL, Amersham International plc) に感光した。インキュベート、洗浄の条件は、ECLplus のプロトコールに従った。洗浄の条件は、10cm x 8cm のニトロセルロース膜に対して10%ブロックエースに0.05% Tween-20 (polyoxyethylene sorbitan monolaurate, Bio-Rad Lab. CA) を入れた洗浄液100mlにつけて室温にて10分ゆっくり揺らすことを、3回くり返した。1次抗体の濃度は、0.1 μ g/mlとし、16時間室温にてインキュベートした。2次抗体の濃度は、1 μ g/mlとし、30分間室温にてインキュベートした。

バインディング アッセイ

マルトース結合蛋白 (maltose-binding protein (MBP)) と HIVN の融合した蛋白質 (MBP-HIVN) (35) を大腸菌にて発現させ、この大腸菌の細胞抽出液を SDS-PAGE で分離、ニトロセルロース

膜にトランスファーした。MBP を選択したのは、この蛋白質は大腸菌にて安定して発現する
うえ、MBP 発現プラスミド(11)が isopropyl-1-thio- β -D-garactopyranoside (IPTG) (56, 57)とい
うラクトース・オペロン誘導物質存在下にて MBP を大量に発現することができるからである。
したがって、MBP-HIVIN は、IPTG 存在下にて大量発現することが可能となる。この MBP-
HIVIN を導入した大腸菌 DH5 α を IPTG にて誘導し 2.5 時間 37 $^{\circ}$ C で培養した後、大腸菌を
200W30 秒を 3 回くり返す条件 (52) で超音波装置 201M (クボタ) にて粉碎して MBP-HIVIN
を含む細胞抽出液を得た。この解析では、ニトロセルロース膜に MBP-HIVIN を結合させ、そ
の膜を scAb2-19, scAbE-Vpr* を含む細胞抽出液を 1 次抗体としてインキュベートをし、2 次抗
体として抗 E-tag 抗体または抗 HA 抗体でインキュベートをして、最後に HRP 標識された抗
体にてインキュベート後 ECL-plus にて発光させた。

HIV ストック

10cm シャーレーに 3×10^6 個になるように播種した 293T 細胞に pLAI10 μ g と pC-scAb2-19、
pC-scAb2-19NLS、pC-Vpr*、pC-scAbE-Vpr*、pC-E7E-Vpr* のいずれか一つとを、合計 20 μ g と
なるようにしてリン酸カルシウム法 (52) にて co-transfection した。pLAI と co-transfection す
る上記プラスミドは、それぞれ 0.1 μ g, 1 μ g, 10 μ g の 3 用量を実験し、合計 20 μ g になるように
不足分は、pC $_X$ N $_2$ KS を DNA 液に混合した。48 時間後に培養上清 10ml を回収して、低速遠心
した後 0.45 μ m-pore-size フィルターでろ過をした。このウイルス液は -80 $^{\circ}$ C にて保存した。

蛋白質解析では、このウイルス液 1ml の底に 200 μ l の 20% スークロースをクッションとして

入れ、15000rpm 16 時間 4℃の条件で遠心をした後上清を取り除き、ウイルスをペレットとして回収した。このペレットは PIPA - バッファーに溶かし SDS-PAGE にて解析するか、もしくは RT アッセイ、 p24 アッセイに使用した。

RT アッセイ、 p24 アッセイ

HIV-1RT 活性 (58) は、[methyl-1'-2'-³H]TTP ([³H]TTP) と Flash Plate Plus (MEN UK) と DEAE フィルターにより測定した(66)。即ち、ウイルスをペレットにしたものを、RT 反応液 (50mM Tris-HCl (pH8.0), 0.05%NP-40, 75mM KCl, 1mM DTT, 5mM MgCl₂, 2.5μg/ml polyadenylic acid, 100nM 5'-biotinylated-(dT)₂₀, 60nM [³H]TTP) に溶解し、37℃にて 18 時間インキュベーションし、TopCount (Packard Instrument Co., Meriden, CT) にて放射線量を測定した。

p24 アッセイ (59, 60) は、各ウイルス液 2 μl を、 HIV 抗原 EIA II 「アボット」 (ダイナボット株式会社) のプロトコールに従い施行した。発色後の吸光度 (OD₄₉₂) を吸光度測定機 DU640 (BECKMAN USA) にて測定した。

MAGI アッセイ

MAGI 細胞 (53) は、子宮癌細胞 Hela 細胞にヒト CD4 (6) を導入して樹立した Hela-CD4 細胞 (53) に、LTR/β-gal 遺伝子を導入して樹立したものである。ヒト CD4 を導入したことに
よりこの細胞に、HIV-1 が感染することができる (6)。LTR/β-gal とは、HIV-1 の LTR に LacZ 遺伝子と HIV-1 Tat に対するレセプターの TRE がついているもので、HIV-1 の複製が行われる

とそのなかの Tat と結合して、LacZ を発現する。すなわち、MAGI 細胞は、HIV-1 が感染して複製すると、LacZ を発現する。このため、HIV-1 が感染して複製された MAGI 細胞は、5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D(-)-galactopyranoside (X-gal) を加えて染色 (X-gal 染色) すると青く染まる(52, 53)。MAGI 細胞を 5×10^4 個播種して 12 時間培養した 24 穴プレートを用意した。培養上清を取り除いた後に、1 μ l, 10 μ l, 100 μ l, 300 μ l, または 500 μ l のウイルス液を、8 μ g/ml のポリブレン (Sigma-Aldrich Research, St.Louis, MO) 存在下で感染させた。2 時間 37°C CO₂ インキュベーターに安置した後、ウイルス液を取り除き DMEM10 を加えて培養した。ウイルス液を加えた時から 48 時間後に上清を取り除き、X-gal 染色(52, 53)をした。青く染色された細胞数を、高感度位相差顕微鏡 IX70 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) 下で計測した。

PCR アッセイ

DNase (endonuclease) (SIGMA Chemical CO. USA) 5000units (合計 100 μ l) を、20ml のウイルス液に加え、1 時間 37°C の条件でインキュベートした。これにより、DNase 処理したウイルス液を準備した (57)。DNase で処理したのは、培養上清中には、ウイルス以外にも、ウイルスが産生することにより死滅した細胞から放出されたウイルス DNA が存在するためである。上記条件にてこのような DNA は完全に処置される (15)。CEM 細胞 10^3 を 100 μ l の RPMI10 に懸濁して、96 穴プレートで培養した。このプレート各穴に、RT アッセイで 10^5 cpm 相当の先の DNase で処理済みのウイルス量に RPMI10 を加えて合計 200 μ l に統一した Vpr-virus または scAbE-Vpr*-virus を感染させた。感染方法は、CEM 細胞培養液に上記ウイルスを含む RPMI10

200 μ l を良く混和することで施行した。感染後、5 分後、2 時間後、4 時間後、8 時間後および 16 時間後に感染細胞を回収した。この感染細胞中の DNA を一緒に、RandD キット（日本ジェネックス）にて回収し、Tris (pH8.0)- EDTA 緩衝液 (TE 液) (52, 57) 10 μ l に融解した。この DNA を含む TE 液 1 μ l をテンプレートとして LTR5' 5' -

GGCTAACTAGGGAACCCACTGCTT-3' と 5NC2 5' -CCGAGTCCTGCGTCGAGAGAGC-3' をプライマーとして、LTR から NC までの部分を PCR 法 (94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 1 分 30 秒 35 サイクル) により増幅した。また、LTR8 5-TCCCAGGCTCAGATCTGGTCTAAC-3 と LTR9 5-GCCTCAATAAAGCTTGCCTTG-3 をプライマーとして ExTaq を用いて タカラ PCR サーマルサーキュラー TP2000 にて、PCR 法 (54) (同上、35 サイクル) により断片を増幅させた後に、増幅された溶液の一部をテンプレートとして LTR8-1 5-CAGAGACCCAGTACAG-3 と LTR9-1 5-TCCCAGGCTCAGATCTGGTCTAAC-3 をプライマーとして PCR 法 (61) (同上、35 サイクル) により増幅させた。これにより、ウイルス DNA が核に移行すると合成される環状構造だけにみられる LTR と LTR が連結した部分 (LTRLTR) が増幅される。LTRLTR は、ほとんど検出されないため、上記のごとく 2 回にわたる PCR 法 (nested PCR) (62) を用いた。また、PCR 法のコントロールとして、 β -globin PCR コントロールプライマーセット (宝酒造) をプライマーとして用いて、PCR 法により宝酒造のプロトコールに従い、94 $^{\circ}$ C 1 分、55 $^{\circ}$ C 2 分、72 $^{\circ}$ C 2 分の条件で、 β -globin を増幅させた。

結果

実験の概要

293T 細胞に pLAI と次にあげる治療分子または実験上のコントロール蛋白質を発現する DNA を co-transfection した。DNA と pLAI の比率は、以下各項目で説明する。すると、293T 細胞の培養上清中にウイルスが産出された。このウイルスを精製して、そのウイルス量、ウイルスの蛋白質の解析、ウイルスの感染力の評価、および、ウイルスの感染力抑制がウイルスの複製のステップのどの段階を抑制しているかについて調べた(Fig.4)。ウイルス量を評価するのに、RT アッセイと p24 アッセイの2つを用いたのは、RT アッセイがウイルス中の RT による逆転写反応を利用すること、p24 アッセイがウイルスの中に含まれる p24 蛋白質にたいする ELISA(70)であり、両測定は、全く異なる方法でウイルス量を評価するからである。感染力の評価に MAGI アッセイを用いたのは、MAGI アッセイではウイルス DNA の複製翻訳後ウイルスの蛋白質が発現することにより染色すると青くなる細胞の数を測定する。今回用いた scAb2-19 のターゲットは、ウイルス DNA の取り込み(インテグレーション)であり、これはウイルスの複製の初期過程 (1、56、61)のステップである。よって、MAGI アッセイは、ウイルス複製初期過程が終了したか否か評価するのに適している。ウイルスの蛋白質の解析をイムノブロットで施行したのは、ウイルス内に scAbE-Vpr*などが取り込まれているかどうか確認するに適しているからである。また、ウイルスの構造蛋白質、特にインテグラーズの量の変化を

評価する目的もある。ウイルスの感染力抑制がどのステップで抑制されているかについて、CEM 細胞にウイルス感染させた後、DNA を PCR 法により解析したのは、ウイルス初期過程のどのステップが抑制されているかを確認するのに適しているからである。

融合蛋白質の発現

pC-scAb2-19、pC-scAb2-19NLS、pC - Vpr*、pC-scAbE-Vpr*、pC-E7E-Vpr* を 293T 細胞にリソ酸カルシウム法にて導入した結果、順に scAb2-19、scAb2-19NLS、Vpr*、scAbE-Vpr*、E7E-Vpr* が得られた (Fig.5)。これらの蛋白質の大きさは、SDS-PAGE で解析することにより、確認した。

scAbE-Vpr* の HIVIN への結合能力

scAb2-19 が HIVIN に強く結合する能力を持っていることに対して、scAbE-Vpr* が同じように HIVIN に結合する能力を有するか否かを調べる為に、バインディングアッセイを施行した。各サンプルとも共通してレーン 1 は negative control なので、バンドは見られない。レーン 2 には、抗 MBP 抗体でインキュベートしたときのみバンドがみられる。レーン 3 は、MBP-HIVIN の誘導がかけられておらず、レーン 4 では誘導がかかっているため、レーン 4 の方が MBP-HIVIN の量が多い。抗 MBP 抗体でインキュベーションしたのもでは、レーン 3 とレーン 4 では、レーン 4 の方が明らかに MBP-HIVIN が多い (Fig.6C)。scAb2-19、scAbE-Vpr* を含む細胞抽出液を 1 次抗体として使用した場合は、レーン 4 の MBP-HIVIN のみが同程度に認められる (Fig.6A, B)。scAbE-Vpr として scAb2-19 の C 末端に蛋白質を融合させても、scAb2-19 の性質であ

る HIVIN への結合能力は損なわれないことを示している。

scAbE-Vpr* を取り込んだ HIV-1 のウイルス発生量の変化

293T 細胞に pLAI10 μ g と pC-scAb2-19、pC-scAb2-19NLS、pC-Vpr*、pC-scAbE-Vpr*、pC-E7E-Vpr*を、co-transfection した培養上清を回収して、RT アッセイと p24 アッセイを施行した。この結果、どのウイルスも RT アッセイと p24 アッセイにおいて、wild type とほぼ同じウイルス量であることが確認された (Fig.7)。一般に、Vpr などのウイルスの粒子の一部を大量に発生させると、ウイルスの発生量に変化が生じる可能性が指摘されるが、この場合は、pLAI に対して co-transfection させる scAbE-Vpr*などの発現遺伝子の DNA 量を変化させても、ウイルス量に変化はなかった。

scAbE-Vpr* を取り込んだ HIV-1 の感染能力

MAGI アッセイを用いて、各ウイルスの初期感染能力の評価をした (Fig.8)。 3×10^6 個の 293T 細胞に pLAI10 μ g と pC-scAb2-19、pC-scAb2-19NLS、pC-Vpr*、pC-scAbE-Vpr*、pC-E7E-Vpr*を、合計 20 μ g となるようにして co-transfection して回収した培養上清を MAGI アッセイした。この結果 1 μ g、10 μ g の pC-scAbE-Vpr*、10 μ g の pC-scAb2-19、及び 10 μ g の pC-scAb2-19NLS では、それぞれ 100%、96%、94%、及び 94%の感染抑制が確認された(Fig.8A, B, C)。対して pC-Vpr*、pC-E7E-Vpr*は、wild type と同じ数の青い細胞が認められ、感染抑制はなかった(Fig.8D, E)。

特に、pLAI10 μ gと10 μ gのpC-scAbE-Vpr*をco-transfectionして得られたウイルスscAbE-Vpr*-virusは、RTアッセイにて10⁷cpmに相当するウイルス量を感染させても、青い細胞はみられなかった。すなわち、scAbE-Vpr*を取り込むことにより、scAbE-Vpr*-virusは完全に感染力を消失したといえる。

scAbE-Vpr* が HIV-1 粒子への取り込まれる能力

Vpr 融合蛋白質が Vpr と同じく HIV-1 粒子に取り込まれるかどうかを確かめる為に、293T 細胞に pLAI と同じ DNA 量のプラスミド(pC-scAb2-19、pC-scAb2-19NLS、pC-Vpr*、pC-scAbE-Vpr*、pC-E7E-Vpr*)と一緒に co-transfection を施行した後に培養上清中に回収されるウイルス粒子の中に scAb2-19、scAb2-19NLS、Vpr*、scAbE-Vpr*、E7E-Vpr*が含まれるかどうかイムノブロットを施行した(Fig.9)。この際、培養上清は RT アッセイによりほぼ等しいウイルス量に統一している。また、これら蛋白質を取り込むことにより、HIVIN の量に変化が生じているかどうかについて、イムノブロットで確認した。この結果、RT と HIVIN は共に、どのウイルスにおいても wild type と同程度の発現を確認できた(Fig.9 上段、中段)。次に、ウイルス粒子中への取り込みを確認したところ、Vpr*、scAbE-Vpr*、E7E-Vpr*は同程度に取り込まれ(Fig.9 下段 レーン 3、4、5)、scAb2-19、scAb2-19NLS は取り込まれていなかった(Fig.9 下段 レーン 2、6)。

scAbE-Vpr* を取り込んだ HIV-1 の増殖はどのステップが抑制されているか

scAbE-Vpr*を取り込んだ HIV-1 が感染が消失した機序は、この時点で Tat を発現する以前のステップでの抑制効果であることは明らかである。そこで、ウイルスが細胞に侵入してのち、どのステップで抑制されているかについて調べるため、Vpr*を取り込んだウイルスと scAbE-Vpr*を取り込んだウイルスを、CEM 細胞に感染後、DNA を回収し PCR をかけた。ウイルスは、細胞に侵入したのち、ウイルス RNA が RT によりウイルス直鎖状 DNA となり、この直鎖状 DNA が宿主細胞の核へ移行すると同時に環状 DNA となり、宿主 DNA に組み込まれる (Fig.10)。したがって、PCR プライマーとしては、直鎖状 DNA を確認する目的で、LTR から NC までの部分、環状 DNA を確認する目的で、LTRLTR 部分をターゲットとした。この環状 DNA になるものは少ないので、nested PCR 法を用いて増幅した (Fig.11A)。LTR から NC までの部分は、Vpr*を取り込んだウイルスと scAbE-Vpr*を取り込んだウイルスとも同じように感染 4 時間めから出現し、感染 8 時間以降でははっきりと認められる (Fig.11C 左レーン 4、5 及び 右レーン 4、5)。LTRLTR 部分は、Vpr*を取り込んだウイルスでは、PCR 産物が認められる (Fig.11D 左レーン 4、5)が、scAbE-Vpr*を取り込んだウイルスでは認められなかった (Fig.11D 右レーン 4、5)。

考察

我々は以前 HIVIN に対する scAb2-19 を作製した(35)。一般に単鎖抗体は抗原との結合能が低下するが、scAb2-19 はイムノブロットに使用可能なほど結合能は保たれた(35、49)。そこで、scAb2-19 が高い効率にウイルス粒子に取り込まれれば、強い抗 HIV 効果を示すようになると考えた。scAb2-19 が高い効率に HIV に取り込まれるようにするために、scAb2-19 を、Vpr と融合させて、scAbE-Vpr* を作製した。この分子が Vpr と同程度にウイルス粒子内に取り込まれ、かつ、HIV の感染力に対して scAb2-19 よりも強い抑制効果を持つことを示した。

Vpr* は、CTVI 戦略のキャリアーとして有用である。

CTVI 戦略のキャリアーとなる分子の条件として高い効率にウイルス粒子中に積極的に取り込まれることがあげられる。Vpr は 2000 コピー近い分子が取り込まれる。対して、HIVIN の前駆体である Pol が約 100 コピーであるから、Vpr は高い効率でウイルス粒子に取り込まれると言える(63)。Vpr は、他の分子と融合させてもその取り込み効率は Vpr と変わらない(18、19、24、64)。今回の研究の結果からも、scAb2-19 ほどの巨大な分子をつけたにも関わらず、scAbE-Vpr* は Vpr* と同等量の分子がウイルスに取り込まれている (Fig.9)。Vpr の他 CA も CTVI 戦略に用いられるが、Vpr ほどの取り込み効率は有さない(16)。また、Vpr 分子との融合部位については、C 末端、N 末端のどちらに分子を融合させても、ウイルス粒子への取り込

みは高い効率である(10, 11, 19)。以上のことから、Vpr*は、CTVI 戦略の高い効率に取り込まれるキャリアーとして適している。

単鎖抗体は、CTVI 戦略の抗ウイルス効果を持つ分子として有用である。

CTVI 戦略の抗ウイルス効果のある分子の条件としては、キャリアーの分子との組み合わせにより抗ウイルス効果を損なわない分子であることである。キャリアーである Vpr との融合には、抗ウイルス効果のある分子の C 末端に Vpr を融合させること、N 末端に融合させることの 2 方法がある (35)。scAb2-19 の N 末端に他の分子を融合させた場合は単鎖抗体の活性が低下し、C 末端に他の分子を fusion させた場合は scAb2-19 の活性が変わらない(35)。そこで、この論文では、scAb2-19 の C 末端に Vpr を fusion させ、scAbE-Vpr*とし、MBP-HIVIN との結合実験 (Fig.6) が示すように IN との結合能力を保存することに成功した。また、scAb2-19 は、HIVIN というウイルス特有の酵素に対する抗体であるため、宿主の細胞に障害をもたらさない(35)。従って、単鎖抗体は、CTVI 戦略に有用である。scAb2-19 以外に報告されている RT の単鎖抗体(36, 37)も CTVI 戦略に使う分子として試す価値がある。

scAbE-Vpr* による感染力抑制の機序。

scAbE-Vpr*を取り込んだウイルス粒子の感染力が 100%抑制された機序は、RT 量とインテグラーゼ量も減少せず、ウイルス量が減少することもなく、十分な量の scAbE-Vpr*が運ばれたからである(Fig.9)。取り込まれた Vpr がすべて Vpr に余分な蛋白質がついた Vpr の変異体に

置き換わったためとも考えられるが、これはバビローマウイルス E7 に対する単鎖抗体と Vpr を融合した蛋白質 E7E-Vpr* を取り込んだウイルスで、感染力が低下しなかったこと (Fig.8) から否定的である。

また、scAbE-Vpr*-virus は、ウイルスが細胞に吸着し、内部の RNA を放出し、その RNA がウイルスの逆転写酵素により DNA にされるところまでは PCR アッセイで確認される (Fig.11C) が、環状 DNA は確認できなかったこと (Fig.11D) は、scAbE-Vpr* が環状 DNA の合成を抑制したことを意味する。scAb2-19 の環状 DNA の合成 (ライゲーションによる LTR と LTR の結合) の抑制の機序は、明確には説明できない。scAbE-Vpr* が PIC に含まれていると予想されることや、scAb2-19 がインテグレースの 228 番から 235 番に結合することから、この部位に scAbE-Vpr* が結合することにより DNA 結合ドメインの働きに影響がでて、PIC の核移行の働きが抑制されている可能性がある。scAbE-Vpr* と DNA 結合ドメインの結合が PIC の構造を変化している可能性もある (49)。また、scAbE-Vpr* が、HIVIN と importin α との結合 (50) に影響して、PIC の核移行を抑制している可能性もある。

従来の CTVI 戦略では、抗ウイルス効果のある分子をウイルスに取り込ませることにより、ウイルスの成熟を阻害して感染力を失わせた。ウイルス量 (Fig.7) やウイルス蛋白質の解析 (Fig.9) からは、scAbE-Vpr* を取り込んだウイルスは、取り込んだことで成熟を阻害したとは考えにくい。scAbE-Vpr* が PIC とともに移動して、ウイルスの複製を抑制したと考える (Fig.1C)。これは、従来にない新しい CTVI 戦略の感染抑制の機序である。従来の CTVI 戦略と比較して、ウイルスの感染力を著しく低下できたのは、この機序の違いも関係している

かも知れない。

遺伝子治療における CTVI 戦略の将来性と scAbE-Vpr* での課題。

今回 scAbE-Vpr*を開発したことにより、CTVI 戦略に用いるのに理想的な分子、すなわち、抗ウイルス効果を持ち、高い効率に取り込まれ、宿主細胞の増殖に障害を持たず、取り込まれるとウイルスの感染力を著しく低下させる分子の開発が可能であることが証明された。この応用として、Vpr の代わりに他に高い効率に取り込まれる分子を使うことや scAb2-19 の代わり他の抗ウイルス効果のある分子を使用することが考えられる。特に、他の重要な酵素に対する単鎖抗体を取り込ませること、例えば、逆転写酵素に対する単鎖抗体が現実的に可能である。また、CTVI 戦略の概念は、従来の遺伝子治療と機序が異なるため(1)、従来の遺伝子治療と併用することが可能である。以上から CTVI 戦略は今後の発展性をもつ遺伝子治療の一つである(13、15)。

しかし、scAbE-Vpr*による CTVI 戦略は限界がある。Vpr*をキャリアーとして使用した点である。Vpr の性質として前述したように G2 arrest が挙げられる。Vpr を高発現した細胞が取れないことを意味する。scAbE-Vpr*を実際の臨床応用する場合、scAbE-Vpr*を高発現する血液幹細胞を作製して患者に投与することが必要であるが、Vpr のこの性質では scAbE-Vpr*を発現する細胞系を樹立することは出来ない。今回、Vpr が G2 arrest を起こさない様に Vpr の C 末端に HA を挿入したが、このことにより確かに Vpr* および scAbE-Vpr*を発現するクローンをとることはできた。Vpr* および scAbE-Vpr*を発現する細胞での、Vpr* および

scAbE-Vpr*の発現は極めて少量である。本研究では、scAbE-Vpr*のトランジェントな系で実験したからこそ scAbE-Vpr*の大量発現に成功し、著しく感染抑制を示すことができたのであって、極めて少量の発現であるクローンではここまでの感染抑制は示さなかったであろう。

Vpr を介した scAb2-19 を用いた CTVI 戦略が有用であるから、今後 Vpr の欠点を補うような優れたキャリアー分子の作製 (16, 64) が課題となろう。

謝辞

Keith Peden 先生(CBER,FDA)には pLAI を、神田忠仁先生(国立感染症研究所遺伝子解析室)には、ヒトパピローマウイルス 16 の E7 に対する単鎖抗体、吉田光昭先生(東京大学医科学研究所)には、293T 細胞を分与していただきました。俣野哲朗先生(国立感染症研究所エイズ研究センター)には、MAGI 細胞、CEM 細胞、を分与していただきました。感謝を申し上げます。

北村唯一教授(東京大学医学部附属病院泌尿器科学教室)には、この論文全体の指導を受けたことを感謝します。河辺香月前教授(東京大学医学部附属病院泌尿器科学教室)には、研究企画の指導を受けましたことを感謝します。

北村義浩先生(国立感染症研究所遺伝子解析室)には、実験方針の指導、実験技術の指導、論文の指導を受けました。神田忠仁先生、吉倉廣先生(国立感染症研究所エイズ研究センター)、吉池邦人先生(National Institute of Health, Thailand)には、実験方針の指導を受けました。石川哲也先生(テルモ株式会社研究開発センター医科学研究所)には、技術的指導を受けました。小林典子先生(国立感染症研究所遺伝子解析室)、緒方敏彦先生(国立感染症研究所遺伝子解析室)、佐久間龍太さん(東京理科大学大学院)には、技術的援助を受けました。感謝を申し上げます。

本研究にあたり、エイズ予防財団リサーチレジデントのフェローシップを受けました。

文献

1. Boeke, J. D., and B. Hahn. 1996. Destroying retroviruses from within. *Trends Microbiol.* 4:421-425
2. 畑中正一 1995 日本における遺伝子治療の基礎実験の現状-エイズ, 蛋白質 核酸 酵素 40. 2753-2758
3. 服部俊夫編 1993 エイズ研究の最先端
4. 徳永研三、古田里佳、川村名子、足立昭夫 1995 ヒト免疫不全ウイルスの制御遺伝子の機能 蛋白質 核酸 酵素 40 1079-1091
5. 古賀泰裕 1995 HIV 感染 臨床免疫 27 1401-1406
6. 足立昭夫、川村名子 1996 HIV 複製の分子基盤 医学のあゆみ 176 17-23
7. 三宅巧一、島田隆 1995 AIDS の遺伝子治療. 最新医学 50 411-417
8. Coffin, J.M., Hughes, S.H., and Varmus, H.E. *Retroviruses* 1997 Cold Spring Harbor Laboratory press.
9. Bukrinsky, M. I., N. Sharova, T. L. McDonald, T. Pushkarskaya, W. G. Tarpley, and M. Stevenson. 1993. Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6125-6129.
10. Cohen, E. A., G. Dehni, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1990. Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein. *J. Virol.* 64:3097-3099.
11. Cohen, E. A., E. F. Terwilliger, Y. Jalinoos, J. Proulx, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1990. Identification of HIV-1 vpr product and function. *J. Acquired Immune Defic. Syndr.* 3:11-18.

12. Natsoulis, G., and J. D. Boeke. 1991. New antiviral strategy using capsid-nuclease fusion proteins. *Nature* 352:632-635
13. Okui, N., Kobayashi, N., and Kitamura, Y. 1998 Vp r-mediated incorporation of a single-chain antibody against human immunodeficiency virus type 1 integrase into virions decreases the viral infectivity. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory press. P202
14. Okui, N., Kobayashi, N., and Kitamura Y. 1998 Production of uninfected human immunodeficiency virus type 1 containing viral protein R fused to a single-chain antibody against viral integrase. *J. Virol.* 72. 6960-6964.
15. Okui, N., Kobayashi, N., and Kitamura, 1998 Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by incorporation of a single-chain antibody reactive to viral integrase as a fusion protein with viral protein R. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Gene Therapy 98. Cold Spring Harbor Laboratory press. P161
16. Okui, N., Kobayashi, N., Sakuma R., Kitamura, T., and Kitamura, Y. (準備中) A critical comparison of Vpr, WXXF motif and CA as a fusion-partner with single chain antibody against viral integration in Capsid-target virus inactivation strategy.
17. DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P.-M. Leong, J. H. Miller, and M. P. Calos. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7:379-387
18. Farnet, C. M., and W. A. Haseltine. 1991. Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J. Virol.* 65:1910-1915.
19. Fletcher, T. M. R., M. A. Soares, S. McPhearson, H. Hui, M. Wiskerchen, M. A. Muesing, G. M.

- Shaw, A. D. Leavitt, J. D. Boeke, and B. H. Hahn. 1997. Complementation of integrase function in HIV-1 virions. *EMBO J.* 16:5123-5138
20. Heinzinger, N. K., M. I. Bukinsky, S. A. Haggerty, A. M. Ragland, V. Kewalramani, M. A. Lee, H. E. Gendelman, L. Ratner, M. Stevenson, and M. Emerman. 1994. The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7311-7315 .
21. Kewalramani, V. N., C. S. Park, P. A. Gallombardo, and M. Emerman. 1996. Protein stability influences human immunodeficiency virus type 2 Vpr virion incorporation and cell cycle effect. *Virology* 218:326-334 .
22. Kimpton, J., and M. Emerman. 1992. Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated -galactosidase gene. *J. Virol.* 66:2232-2239 .
23. Serio, D., T. A. Rizvi, M. Cartas, V. S. Kalyanaraman, I. T. Weber, H. Koprowski, and A. Srinivasan. 1997. Development of a novel anti-HIV-1 agent from within: effect of chimeric Vpr-containing protease cleavagesite residues on virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3346-3351
24. Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. Kim, P. Seshiah, G. Natsoulis, J. D. Boeke, B. H. Hahn, and J. C. Kappes. 1995. Targeting foreign proteins to human immunodeficiency virus particles via fusion with Vpr and Vpx. *J. Virol.* 69:3389-3398.
25. Wu, X., H. Liu, H. Xiao, and J. C. Kappes. 1996. Proteolytic activity of human immunodeficiency virus Vpr- and Vpx-protease fusion proteins. *Virology* 219:307-313 .
26. Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. A. Conway, and J. C. Kappes. 1996. Inhibition of human and simian

- immunodeficiency virus protease function by targeting Vpx-protease-mutant fusion protein into viral particles. *J. Virol.* 70:3378-3384
27. Park, I. W., and J. Sodroski. 1996. Targeting a foreign protein into virion particles by fusion with the Vpx protein of simian immunodeficiency virus. *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 11:341-350
28. Wong-Staal, F., P. K. Chanda, and J. Ghayeb. 1987. Human immunodeficiency virus: the eighth gene. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 3:33-39 .
29. Liu, H., X. Wu, H. Xiao, J. A. Conway, and J. C. Kappes. 1997. Incorporation of functional human immunodeficiency virus type 1 integrase into virions independent of the Gag-Pol precursor protein. *J. Virol.* 71:7704-7710 .
30. Matsuda, Z., M. J. Chou, M. Matsuda, J. H. Huang, Y. M. Chen, R. Redfield, K. Mayer, M. Essex, and T. H. Lee. 1988. Human immunodeficiency virus type 1 has an additional coding sequence in the central region of the genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6968-6972 .
31. Withers-Ward, E. S., J. B. M. Jowett, S. A. Stewart, Y.-M. Xie, A. Garfinkel, Y. Shibagaki, S. A. Chow, N. Shah, F. Hanaoka, D. G. Sawitz, R. W. Armstrong, L. M. Souza, and I. S. Y. Chen. 1997. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with HHR23A, a cellular protein implicated in nucleotide excision DNA repair. *J. Virol.* 71:9732-9742 .
32. Wu, X., H. Liu, H. Xiao, J. A. Conway, E. Hunter, and J. C. Kappes. 1997. Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein. *EMBO J.* 16:5113
33. Lu, Y.-L., P. Spearman, and L. Ratner. 1993. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R

- localization in infected cells and virions. *J. Virol.* 67:6542-6550 .
34. Mahalingam, S., V. Ayyavoo, M. Patel, T. Kieber-Emmons, and D. B. Weiner. 1997. Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *J. Virol.* 71:6339-6347 .
 35. Kitamura, Y., T. Ishikawa, N. Okui, N. Kobayashi, T. Kanda, T. Shimada, K. Miyake, and K. Yoshiike. Intracellular expression of a single-chain antibody against integrase of human immunodeficiency virus type 1 inhibited the viral replication at both early and late steps of the viral life cycle. *J. Acquired Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, in press.
 36. Levy-Mintz, P., L. Duan, H. Zhang, B. Hu, G. Dornadula, M. Zhu, J. Kulkosky, D. Bizub-Bender, A. M. Skalka, and R. J. Pomerantz. 1996. Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* 70:8821-8832 .
 37. Shaheen, F., L. Duan, M. Zhu, O. Bagasra, and R. J. Pomerantz. 1996. Targeting human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle. *J. Virol.* 70:3392-3400 .
 38. Balakrishnan, M., and Jonsson, C., B. 1997 Functional identification of nucleotides conferring substrate specificity to retroviral integrase reactions. *J. Virol.* 71 1025-1035
 39. 増田貴夫 1998 HIV-1 インテグレーションと複製 ウイルス 48 19-25
 40. Zheng, R., Jenkins, T. M., and Craigie, R., 1996 Zinc fold the N-terminal domain of HIV-1 integrase, promotes multimerization, and enhances catalytic activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 13659-13664

41. Nakamura, T., Masuda, T., Goto, T., Sano, K., Nakai, M., and Harada S., 1997 Lack of infectivity of HIV-1 integrase zinc finger-like domain mutant with morphologically normal maturation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 715-722
42. Ogata, T., Kobayashi, N., Okui, N., and Kitamura, Y. 1998 HIV-1 integrase with its HCC domain replaced with that of RSV but not HIV-2 or HERV inhibits the wild type integrase activity in a trans-dominant manner. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory press. 56
43. Engelman, A., and Craigie, R., 1992 Identification of conserved amino acid residues critical for human immunodeficiency virus type 1 integrase function in vitro. *J. Virol.* 66 6361-6369
44. LaFemina, R., Callahan, R.L., and Cordingley, M.G., 1991 Substrate specificity of recombinant human immunodeficiency virus integrase protein. *J. Virol.* 65 5624-5630
45. Vink, C., and Oude Groeneger, A.M., 1993 Identification of the catalytic and DNA-binding region of the human immunodeficiency virus type 1 integrase protein. *Nucleic Acids res.* 21 1419-1425
46. Eijkelenboom, A.P., Lutzke, R.A., Boelens, R.H., Plasterk, R.H., Kaptein, R., and Hard, K., 1995 The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH 3-like fold. *Nature Structural Biology.* 2 807-810
47. Lodi, P., Ernst, J., Kuszewski, J., Hickman, A.B., and Gronenborn A.M. 1995 Solution structure of the HIV integrase protein. *Nucleic Acids Research.* 22 4125-4131
48. Ishikawa, T., Okui, N., Kobayashi, N., Sakuma, R., and Kitamura, Y. (投稿中) A collection of monoclonal antibodies against the minimal DNA-binding domain in the carboxyl terminal region of human immunodeficiency virus type 1 integrase

49. Galloway, P., Hope, T., Chin, D., and Trono, D., 1997 HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin / karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 9825-9830
50. Niwa, H., K. Yamamura, and J. Miyazaki. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108:193-199 .
51. Spector, D., Goldman, R., D. and Leinwand, L., A. *Cells. A Laboratory Manual* 1997 Cold Spring Harbor Laboratory press.
52. Sambrook, J., Fritsch, E., F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning Cells. A Laboratory Manual* 1989 Cold Spring Harbor Laboratory press.
53. Kimpton, J. and Emerman M. 1992 Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene. *J Virol* 66
54. Sakai, K., *Virus Production in Neoplastic Cell Lines*. 1996 Training Program For Virological Diagnosis of HIV Infection. 国立予防衛生研究所 (現 国立感染症研究所) 編 B-1
55. Peden, K., M. Emerman, and L. Montagnier. 1991. Changes in growth properties on passage in tissue culture of viruses derived from infectious molecular clones of HIV-1LAI, HIV-1MAL, and HIV-1ELI. *Virology* 185:661-672 .
56. 北村義浩 1990 大腸菌の取扱法 ラボマニュアル遺伝子工学 増補版 40-48
57. 村松正実編 ラボマニュアル遺伝子工学 増補版 1990
58. Yokota, Y., RT assay. 1996 Training Program For Virological Diagnosis of HIV Infection. 国立予

防衛生研究所（現 国立感染症研究所）編 B-6

59. 吉原なみ子 1995 感染者同定のための HIV 検査. エイズ研究の最先端 78-91
60. Yoshihara, N Serodiagnosis by PA, ELISA, WB, and Blot assay. 1996 Training Program For Virological Diagnosis of HIV Infection. 国立予防衛生研究所（現 国立感染症研究所）編 B-3
61. Honda, M., HIV isolation from peripheral mononuclear cells and Polymerase Chain Reaction (PCR), RNA-PCR, and Sequencing. 1996 Training Program For Virological Diagnosis of HIV Infection. 国立予防衛生研究所（現 国立感染症研究所）編 B-2
62. Sato, H., Detection of HIV Infection by Nested PCR. 1996 Training Program For Virological Diagnosis of HIV Infection. 国立予防衛生研究所（現 国立感染症研究所）編 B-4
63. Varmus, H., and P. Brown. 1989. Retroviruses, p. 53-108. In D. E. Berg, and M. M. Howe (ed.), Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
64. BouHamdam M., Xue Y., Baudat Y., Hu B., Sire J., Pomerantz R.J., and Duan L. 1998 Diversity of HIV-1 Vpr interactions involves usage of the WXXF motif of host cell proteins. J Biol Chem. 273: 8009-8016.

図説明

Fig.1

今まで報告された CTVI 戦略

(上段) CA に抗ウイルス効果のある分子を融合させた分子を取り込ませることによる CTVI 戦略: ウイルス粒子に CA と共に取り込まれた分子が内部からウイルス RNA を破壊することによりウイルスの感染力は低下する。

(中段) Vpr に抗ウイルス効果のある分子を融合させた分子を取り込ませることによる CTVI 戦略

(下段) (想像図) 今回の研究: Vpr に抗ウイルス効果のある分子を融合させた分子を取り込ませることによる CTVI 戦略: 上記2方法と異なり、ウイルス粒子を中から破壊するのではなく、ウイルスの RNA とその周辺蛋白質でつくられる PIC と共に宿主細胞へ移動する。しかし、PIC に含まれた抗体が PIC 内部の酵素の働きを抑制する。

Fig2

A 一般的な抗体の模式図：IgG抗体とは、4本のポリペプチドから成る150kDaの大きな分子であり、とても2本の軽鎖（L鎖、25kDa）と2本の重鎖（H鎖、50kDa）がジスルフィド結合によって結合した構造を持つ。各鎖とも1つの大きさが約110個のアミノ酸から成る亜領域から構成されている。L鎖とH鎖は、それぞれ2個と4個の亜領域から構成される。最もアミノ末端に存在する亜領域のアミノ酸配列は抗体分子間で大きく異なっており、その為此の亜領域は可変領域（variable region, Vドメイン）と呼ばれる。それに対してその他の亜領域においては、そのアミノ酸配列が抗体分子間でほとんど変化していないので、これらの亜領域は定常領域（constant region, Cドメイン）と呼ばれる。通常、L鎖とH鎖のそれぞれのVドメインはそれぞれ V_L 、 V_H と記される。B 単鎖抗体の模式図：単鎖抗体とは、遺伝子組み換え技術を利用して、 V_L と V_H とを15アミノ酸程度の長さのリンカーと呼ぶペプチドで結合させて、特異的に抗原に結合する性質を有する蛋白質のことである。

Fig.3

PCxN₂Ks のマップ: ニワトリの β -アクチンのプロモーター (点線枠) とそれに連続した cDNA

領域 (黒枠) を持つ。SV40 のオリジン (斜線枠) を有する。全長は約 6 kb である。

Fig.4

実験の概要（結果参照）

Fig5

今回作成した蛋白質の模式図。各蛋白質は、Fig.3 の pCxN₂KS の cDNA 領域に DNA として挿入した。各蛋白質の大きさは、SDS-PAGE にて計測した。模式図の各蛋白質は実際の比率とは異なる。

Fig.6

scAbE-Vpr*と HIVIN との結合能力の確認。ニトロセルロース膜に、scAbE-Vpr*(A)または scAb2-19 (B) を含む 293T 細胞の細胞抽出液を、抗 MBP 抗体(C)と同様にインキュベーションした。ニトロセルロース膜には、大腸菌 DH5 α の細胞抽出液(レーン 1)、精製された MBP(レーン 2)、MBP-HIVIN を発現する大腸菌に誘導していない細胞抽出液(レーン 3)及び誘導した細胞抽出液(レーン 4)を、SDS-PAGE にて分離したものを写した。(材料と方法参照)

Fig.7

培養上清中のウイルス量の計測。293T 細胞に、pLAI 10 μ g と、DNA 0.1 μ g (白色棒)、DNA 1 μ g (灰色棒) または DNA 10 μ g (黒色棒)を、co-transfection した。各上清とも精製後、RT アッセイ (A) と p24 アッセイ (B) を施行した。Wild type (control)を得るために、293T 細胞に pLAI 10 μ g と pC_XN₂KS 0.1 μ g (斜線棒) を co-transfection して上清を得た。(材料と方法参照)

(A) RT アッセイ : 縦軸に、RT 活性量 (RT activity)として、計測された放射線量 (cpm) を記した。標準検量線 (Standard) は、精製 RT (Boehringer Mannheim GmbH) を、10 μ U から 10mU に希釈して計測した。この検量線の 10² から 10⁵ は、直線上にある。各サンプルとも上清 100 μ l を計測した。

(B) p24 アッセイ : 縦軸に、p24 アッセイによる吸光度 OD₄₉₂ の値 (p24 OD₄₉₂)として記した。標準検量線 (Standard) は、精製 p24 蛋白質 (Boehringer Mannheim GmbH) を、10²fg から 10⁶fg に希釈して計測した。この検量線の 10⁴ から 10⁵ は、直線上にある。各サンプルとも上清 2 μ l を計測した。

Fig.8

Co-transfection にて得られたウイルスの感染力を、MAGI アッセイにて計測した。縦軸は、MAGI アッセイにおける青く染色された細胞数をしめす。横軸は、MAGI 細胞に感染させた各ウイルスの量を、RT アッセイの値(cpm)で示す。293T 細胞に、pLAI 10 μ g と、pC α N $_2$ KS 10 μ g (正方形)、DNA 0.1 μ g 及び pC α N $_2$ KS 10 μ g (菱形)、DNA 1 μ g 及び pC α N $_2$ KS 9 μ g (円形) または DNA 10 μ g (三角形)を、co-transfection した培養上清を、精製後感染実験に使用した。(材料と方法参照)

Fig.9

pLAI 10 μ g と DNA を co-transfection した 293T 細胞の精製した培養上清 5ml に含まれるウイルス粒子の蛋白質をイムノブロットにて解析した。pLAI と pC_XN₂KS (レーン 1)、pC-scAb2-19 (レーン 2)、pC-scAbE-Vpr* (レーン 3)、pC-Vpr* (レーン 4)、pC-E7E-Vpr* (レーン 5) 及び pC-scAb2-19NLS (レーン 6) の組み合わせで施行した。コントロールとして pC-scAb2-19 (レーン 7) 又は pC-scAbE-Vpr* (レーン 8) を transfection した 293T 細胞の細胞抽出液を用いた。抗 RT 抗体 (α -RT Ab) (上段)、抗 HIVIN 抗体 (Fig.9 でのみ α -IN Ab と記す) (中段) 及び抗 HA 抗体 (α -HAAb) と抗 E-tag 抗体 (α -E-tag Ab) (下段) を使用したイムノブロットを施行した。(材料と方法参照)

Fig.10

(上段) scAbE-Vpr* (灰色円形)を取り込んだウイルスが、細胞に侵入して宿主 DNA に取り込まれるのを scAbE-Vpr*により抑制されているところを示す模式図(想像図)(文献 8 より改編)。scAbE-Vpr*を取り込んだウイルスは、細胞に侵入した後、脱殻する。内部のウイルス RNA (灰色)は、逆転写されウイルス DNA (白色)になる。この時、DNA は直鎖状 DNA の構造をとる。PIC は、宿主細胞の核に核移行すると核内のラーゲースにより DNA は、環状 DNA となる。環状 DNA は、核移行を意味する。次に、ウイルス DNA は、宿主 DNA に組み込まれる。この組み込み後、DNA は転写、翻訳、ウイルス産生へと進む。scAbE-Vpr*が取り込まれていることにより、逆転写、核移行、宿主 DNA への組み込みのどのステップが抑制されているか確認する必要がある。

(下段) 直鎖状 DNA から環状 DNA になることを、模式的に示す。直鎖状 DNA は、両端に LTR 構造を持つ。環状 DNA は、LTR と LTR がライゲーションされることにより、LTRLTR 構造を持つ。図中矢印は、Fig.11 のプライマーを意味する。

Fig.11

CEM にウイルスを感染後、その DNA を取り出して PCR 法により LTR から NC まで(A 上段、C) と LTRLTR (A 下段、D)を増幅した。(A) PCR 法でもちいるプライマーの結合部位を示す。LTR から NC まででは、LTR5 と NC5 を使用した。LTRLTR は、Nested PCR 法にて施行した。1 回目は、LTR8 と LTR9 を使用し、2 回目は、LTR8-1 と LTR9-1 を使用した。

(B) (C) (D) PCR 法により増幅された産物を、0.8%アガロースゲル (56)にて電気泳動をしたのち、エチジウムブロマイド染色 (56)したものである。左カラムは、CEM に Vpr*-virus を感染させた。右カラムは、CEM に scAbE-Vpr*を感染させた。両方とも、感染 5 分 (レーン 1)、2 時間 (レーン 2)、4 時間 (レーン 3)、8 時間 (レーン 4) 及び 16 時間 (レーン 5) 感染後、CEM より DNA を回収した。DNA をテンプレートとして、 β -globin 用(B)、LTR から NC 用(C)、 LTRLTR 用 (D) のプライマーで PCR 法により増幅した。(材料と方法参照)

Fig. 1

CTVI strategy (capsid-targeted viral inactivation)
VTVI strategy (virion targeting viral inactivation)
destroying retroviruses from within

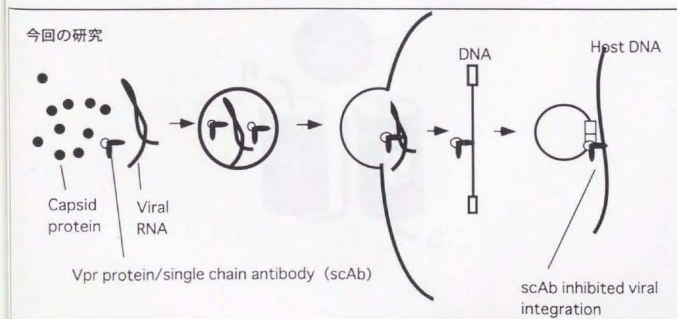
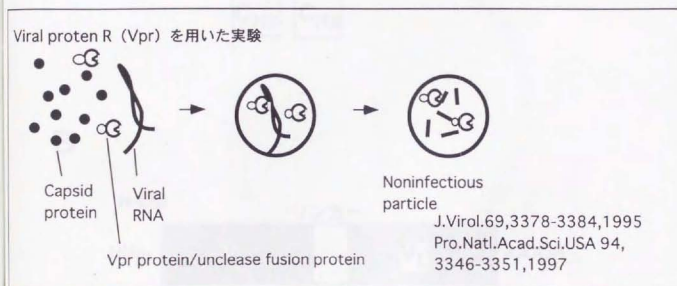
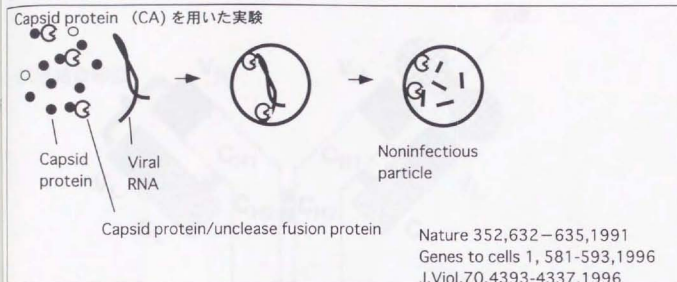
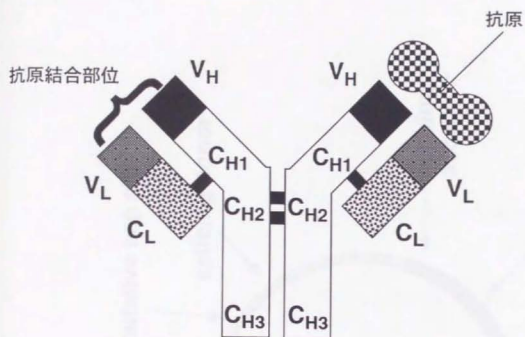


Fig. 2

A



B

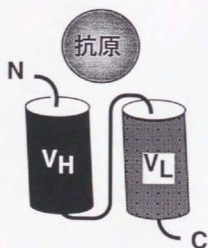
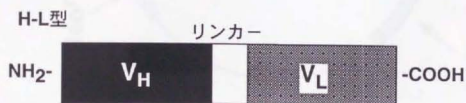


Fig. 3

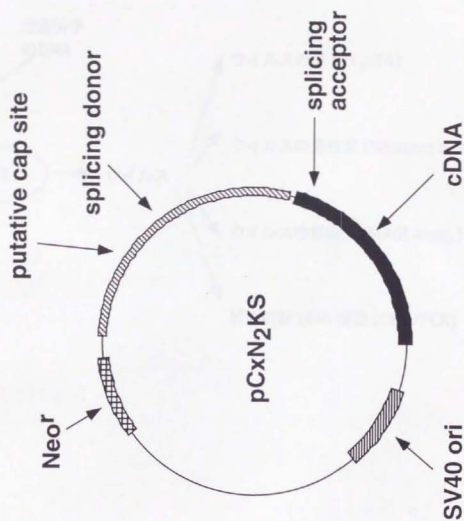


Fig. 4

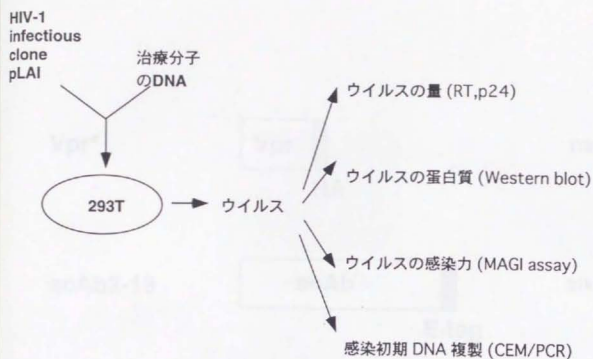


Fig. 5

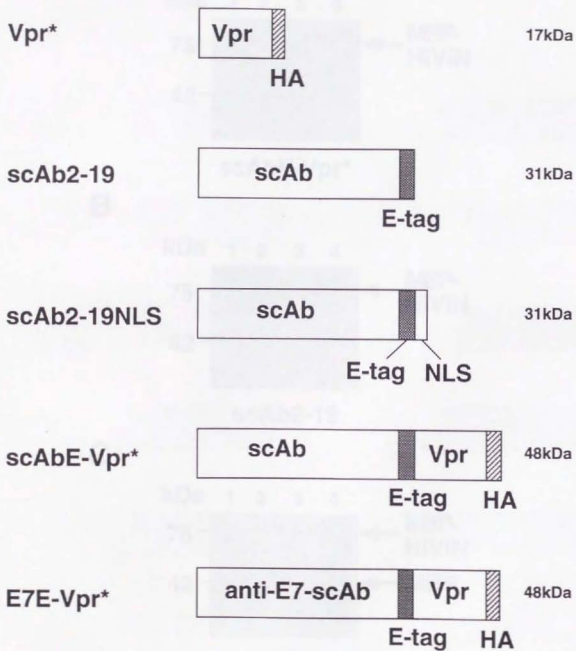
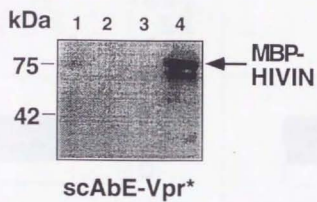
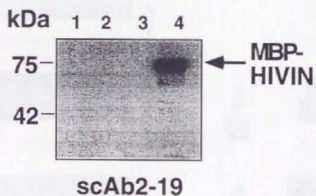


Fig. 6

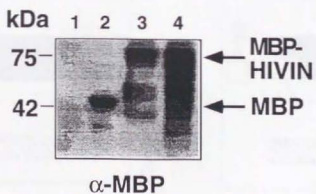
A



B



C



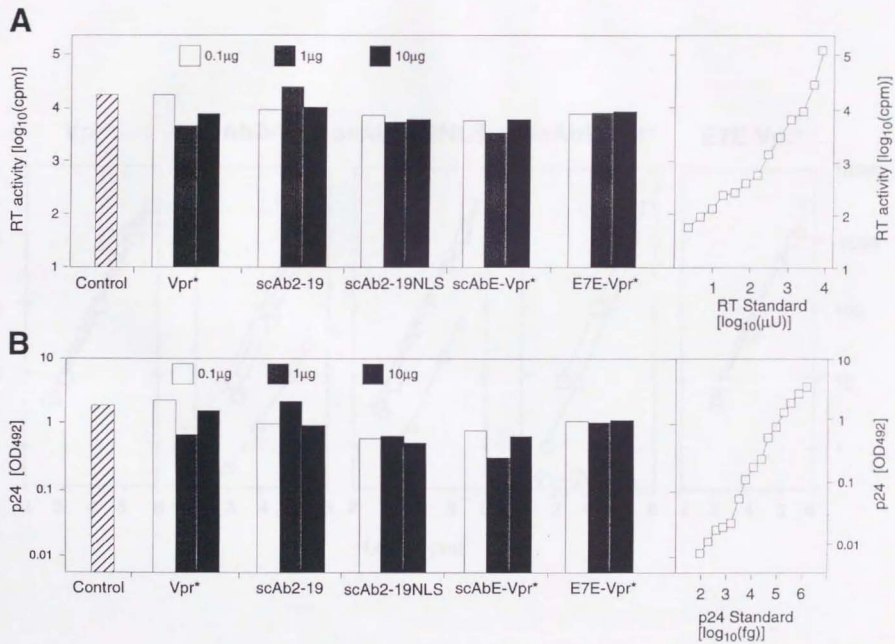


Fig. 7

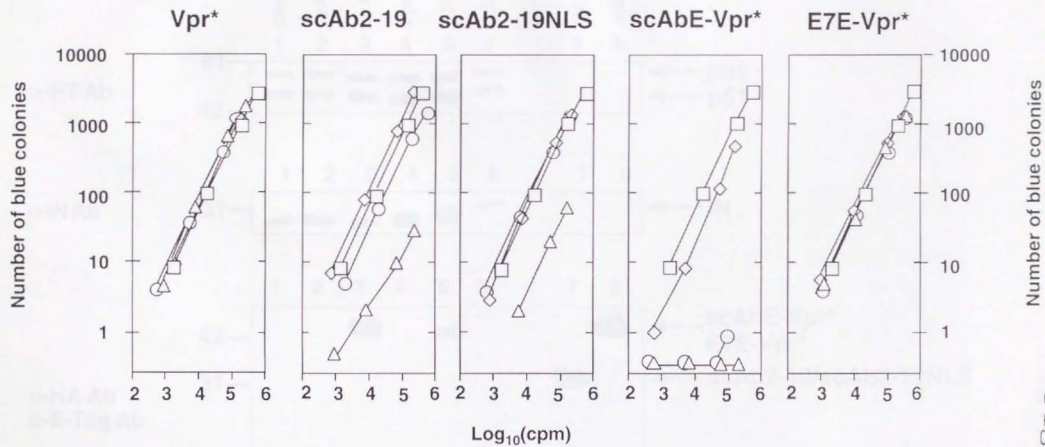


Fig. 8

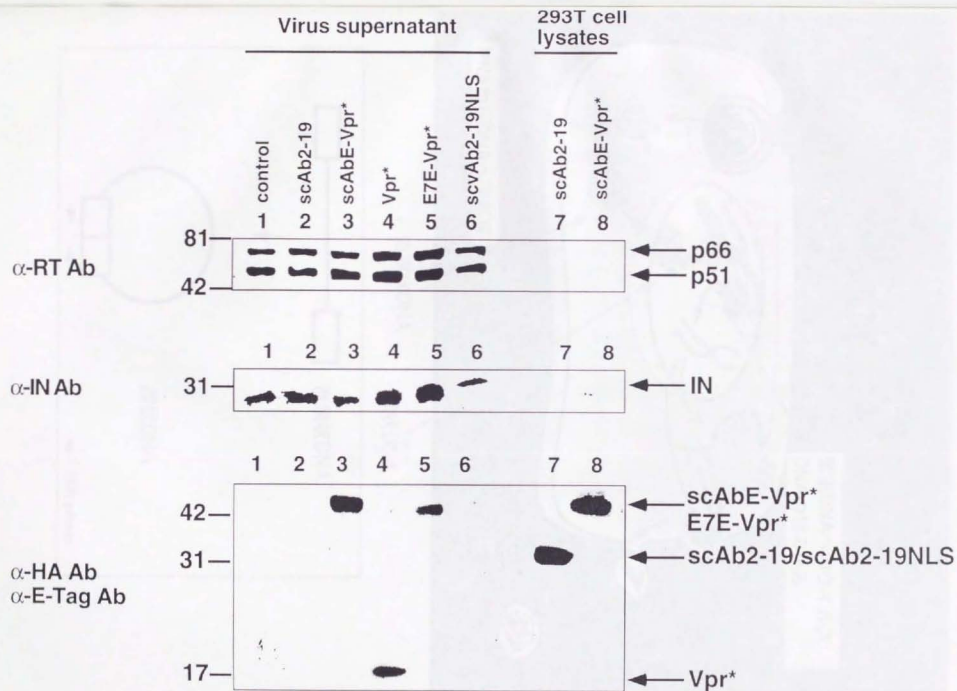


Fig. 9

Fig. 10

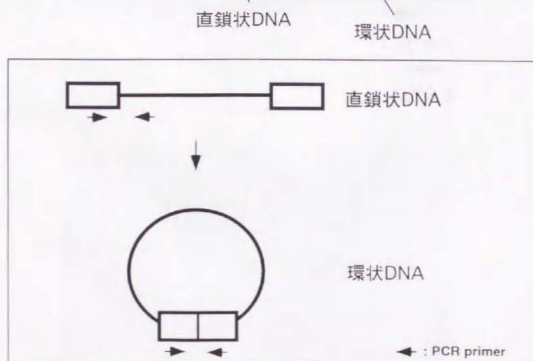
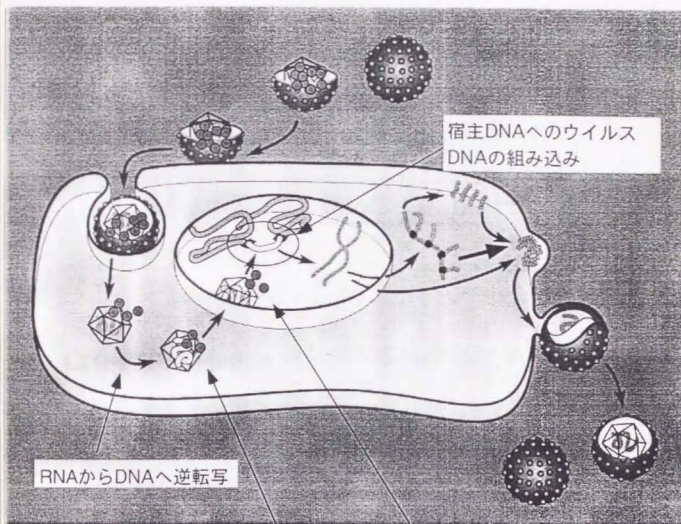
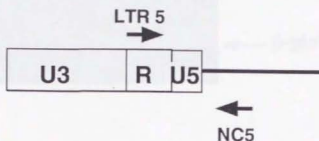


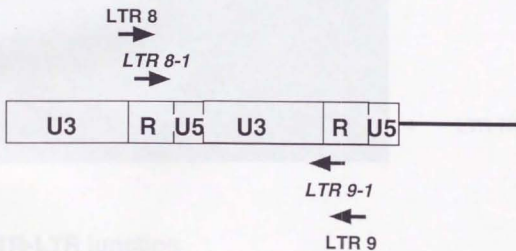
Fig. 11A

A

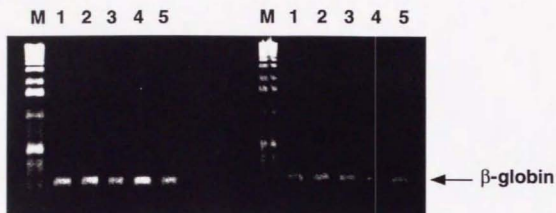
Fully reverse transcribed DNA



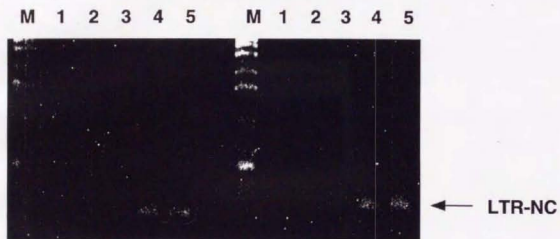
LTR-LTR junction



B control

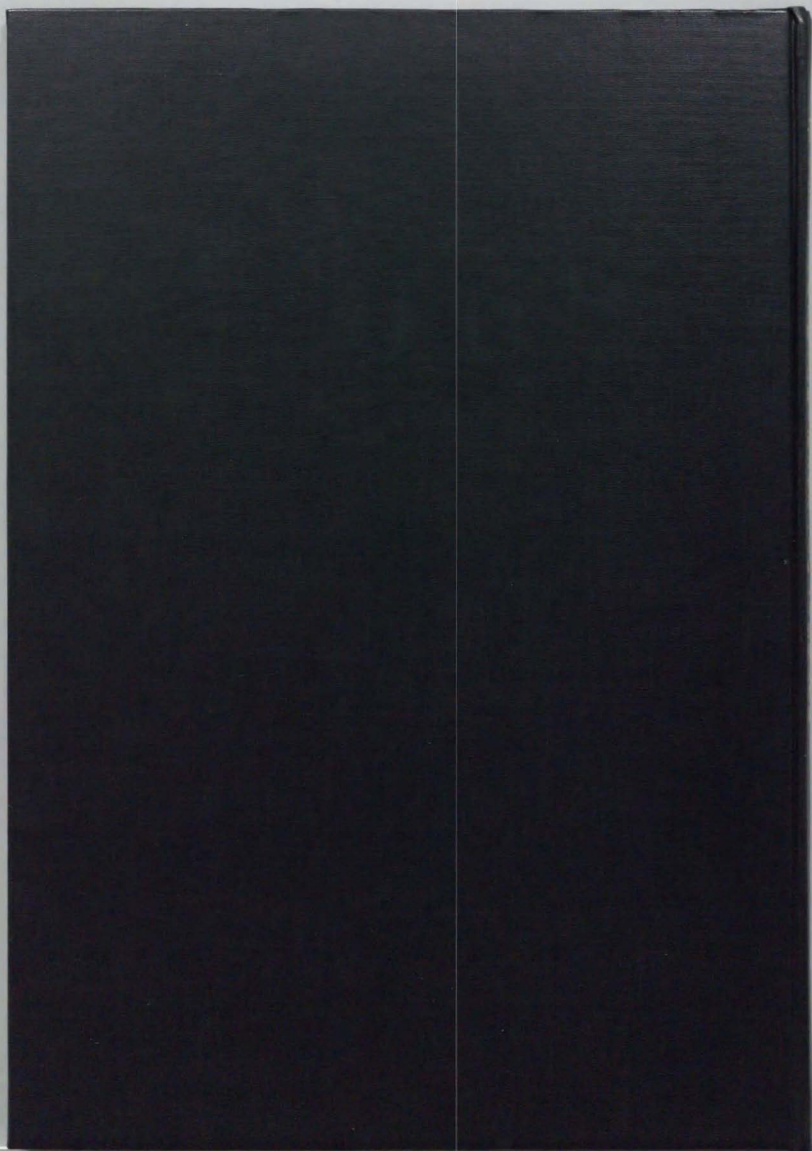


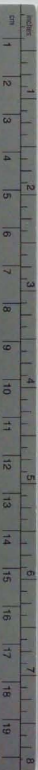
C Fully reverse transcribed DNA



D LTR-LTR junction



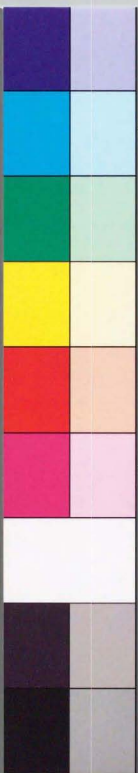




Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

