

分子ウイルス学研究ユニット

Retrovirus Research Unit

研究ユニットリーダー 間 陽子

AIDA, Yoko

エイズと成人 T 細胞白血病を引き起こすヒトレトロウイルス (HIV-1 と HTLV-1) および地方病性ウシ白血病を誘発する牛レトロウイルス (BLV) は、進化過程において、通常のレトロウイルスに共通な遺伝子群の他に、その増殖を制御する調節遺伝子と多くのアクセサリ遺伝子群による複雑な増殖制御機構を獲得してきた。当研究ユニットでは、これらウイルスの生物学的特性を担っていると考えられる調節遺伝子やアクセサリ遺伝子に焦点をあて、それらの遺伝子産物の作用機構と機能発揮に関与する宿主因子を検索し、それらとの相互作用を介して制御される情報伝達機構の解明を目指している。また、これらウイルスによる疾患発症の感受性を規定する宿主の遺伝学的背景について分子レベルでの解析を精力的に進めている。以上の研究を通し、エイズと白血病発症機構の全容解明を目指すと共に、これらのレトロウイルスの新しい制御法の確立と、これら疾病の新たな予防、診断と治療の道を拓きたい。

1. エイズウイルスの病原性発現機構の解明 (間, 笠原 (仁田原) *¹, 松田 *¹, 橋爪 *², 倉光 *², 宗田 *², 木全 *², 鈴木 *²)

Vpr は HIV 粒子に取り込まれるアクセサリ遺伝子産物であり、HIV-1 Pre-integration complex (PIC) のマクロファージにおける核移行に重要である。これまで我々は、Vpr が importin α のみを介して核移行することを明らかにしてきた。本研究では、Vpr の核移行能と、Vpr と importin α および β との結合能との相関性を、典型的な核移行を示す SV-40 NLS と比較した。*in vitro* 核移行解析と importin α および β との結合を GST-pull down assay で解析した結果、Vpr は importin β の量依存的に核移行能が抑制され、同時に importin α との結合が失われる競合阻害が認められた。次に、 α 側の importin β binding domain を欠失した変異体 Δ IBB importin α を用いて同様の解析を行った結果、Vpr は Δ IBB importin α と結合し核移行したが、予想に反して、importin β はその過程と Vpr の核膜への局在をも阻害した。以上の結果から、Vpr の核移行には importin α との結合と核膜局在が必要であることが明らかとなった。また、最終分化マクロファージに Vpr をマイクロインジェクション後、蛍光バイオイメージング解析を行うと、Vpr は生細胞内においても核移行を示したが、importin α との結合および核膜局在を失った Vpr 変異体は、核移行能を完全に消失していた。さらに、これらの Vpr 変異体を有する HIV-1 は最終分化マクロファージへの感染効率が著しく減少した。以上の結果から、マクロファージへの感染は Vpr の核移行および核膜局在を消失するだけで、阻止できることが示唆された。

最近我々は、Vpr と特異的に相互作用する細胞内因子として spliceosome-associated protein 145 (SAP145) の単離に成功し、Vpr はスプライソソーム中で SAP145、さらに核内低分子リボ核タンパク質群と相互作用することにより、細胞遺伝子のスプライシング反応を阻害することを世界に先駆けて見いだした。次に、Vpr による HIV-1 のスプライシングへの影響を調べた。HIV-1 mRNA は 1 本のゲノ

ム DNA から転写され、大きく分けて 9K, 4K および 2K フォームが合成される。さらに、各フォームの中には多種類の mRNA が含まれており、少なくとも 30 種類以上あるとされている。その多様性は選択的スプライシングにより制御されており、ウイルスの生活環に大きな役割を果たしていると考えられているが、その生成機構は未だ不明である。そこで、Vpr の HIV-1 ゲノムのスプライシングパターンに対する影響を HIV-1 の cDNA NL432 より Gag-Pol 領域の大部分を欠失した p Δ PSP (p Δ PSP Δ Vpr) を Vpr 発現ベクターと HeLa 細胞に共導入し、RNA を抽出し、半定量的 RT-PCR 法により解析した。Vpr が存在する場合、4K フォームの増加と 2K フォームの減少が観察された。次に、各フォーム内の mRNA 種を調べるために、アクリルアミドゲルにて泳動した結果、Vpr は HIV-1 mRNA のパターンに影響を及ぼす可能性を初めて見いだした。さらに、HIV-1 の 1 種類の mRNA を特異的に増やすプライマーを設計し、real-time PCR 法により定量した結果、Vpr 存在下で、4K フォームでは *env* 1, 5 および 8 mRNA の増加、2K フォームでは *rev* 2 mRNA の増加と、*tat* 1 および 2 mRNA 減少が観察された。興味深いことに、NL432 あるいは NL432 Δ Vpr HIV-1 を感染させた molt4 細胞においても、Vpr の存在および非存在において各 mRNA の量比に変化が観察されたが、その効果はトランスフェクション系より顕著であった。この成果は未解決である 30 種類以上も存在する HIV-1 ゲノムのスプライシングパターンの生成機構を解明する研究につながる可能性がある。次に実際に Vpr が HIV-1 プロウイルスから転写された pre-mRNA を蓄積させることができるか否かを検討した。HIV-1 の 3 つの転写産物の中で、9 kb および 4 kb mRNA は不完全にスプライシングを受けた転写産物である。REV はこれらに存在する RRE に結合して RNA を強制的に核外移行し、タンパク質生産を可能にする。そこで、Rev による核外移行を防ぐために、NL432 より gag-pol 領域、*vpr* 遺伝子および RRE 配列を欠損させたクローンを構築し、HeLa 細胞に導入後 real-time PCR で Vpr の有無における 9 kb およ

び 4 kb mRNA を定量した。その結果、Vpr の発現によって 9 kb および 4 kb の増加が観察された。以上の結果から、Vpr は細胞側の遺伝子と同様に、HIV-1 プロウイルスから転写された pre-mRNA に対しても蓄積させる効果があることを世界に先駆けて明らかにした。さらに、Rev 依存的タンパク質合成を示す Env mRNA と Env mRNA がスプライシングされてできる Nef mRNA に着目した。Env および Nef コード領域を CMV プロモーターの下流に連結した。この構築物からの転写産物は、スプライシングされなければ RRE 配列を持ち Env と Vpu をコードする mRNA に、スプライシングされると Nef をコードする mRNA になる。この系では、Env および Nef タンパク質を測定することで Rev 存在下における Vpr の RNA スプライシングへの影響を解析することを可能にする。構築したベクターには検出を容易にするために Env には HA タグを、Nef には GFP を付加した。EnvHA/NefGFP 発現ベクターを HeLa 細胞に導入し、24 時間培養後に回収したタンパク質のウエスタンブロッティングを行い Env-HA と Nef-GFP を検出した。Rev の非存在下において Vpr の共発現により Nef の増加が観察された。一方、Rev の存在下では、Vpr の共導入により Env の増加が観察されたが、Nef の量はコントロールと同レベルであった。以上の結果から、Vpr は Rev 依存的タンパク質発現を促進することが初めて明らかとなった。

2. ヒトおよびウシレトロウイルスによる白血病発症機構の解明 (間, 竹嶋 ^{*1}, 佐藤 ^{*1}, 赤松 ^{*2}, 加堂 ^{*2}, 白鳥 (田島) ^{*3}, 岡田 ^{*4})

BLV は地方病性牛白血病 (EBL) の原因ウイルスであり、成人 T 細胞白血病の原因ウイルスである HTLV-I と最も近縁なレトロウイルスである。BLV 感染牛は、未発症健康、持続的リンパ球増多症および白血病発症の 3 つの異なる病態を示す。我々はこのような個体差が生じる原因の 1 つが、ウシ主要組織適合抗原 (MHC) (BoLA)-DR 分子の多型性にあることを示してきた。しかし、牛白血病の発症には複数の因子が関与することが示唆されていることから、本研究では DR に次いで多型性に富む DQ に着目した。まず、多数ある DQA1 と DQA2 のアレルと疾患との関連性を解析するために、新たに DQA1 および DQA2 に対する PCR-SBT 法を開発した。さらに、それを用いて牛白血病発症に関与する DQA アレルを探索するために、BLV 感染健康牛 23 頭および白血病発症牛 29 頭のタイピングを行ったところ、DQA1 アレル 13 種類と DQA2 アレル 6 種類が同定された。各々のアレルを 2 群で比較したところ、DQA1*0101 の頻度は BLV 感染健康牛では 24% であるのに対して、白血病発症牛では 0% であり、非常に強い相関性が認められた ($p = 0.0002241$)。さらに、野外牛 83 頭のアレル頻度を算出したところ、DQA1*0101 の頻度は 14% であり、未発症健康牛のそれと同レベルであった。この DQA1*0101 と他のアレルがコードする DQ 分子 α 鎖のアミノ酸配列を比較したところ、75 番目のアミノ酸残基が DQA1*0101 ではバリンであるのに対し、他のアレルは全てがイソロイシンであった。ヒト MHC DQ 分子の立体構造を参考にすると、このアミノ酸残基はペプチド収容溝に位置し抗原ペプチドを認識するのに重要な残基であった。従って、T 細胞に提示される抗原ペプチドの種類が異なることが疾患感受性の

個体差が生じる原因である可能性が示唆された。

^{*1} 協力研究員, ^{*2} 研修生, ^{*3} 共同研究員, ^{*4} 客員研究員

We focused on the molecular mechanisms of AIDS induced by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and leukemogenesis induced by bovine leukemia virus (BLV).

Vpr, one of the accessory gene products of HIV-1, is a 96-residue protein with several functions. It is involved in import of the HIV-1 preintegration complex into the nucleus of nondividing cells, in cellular differentiation, inducing cell cycle arrest at the G₂/M phase, in immune suppression, and in enhancement of replication of the virus. We first found that HIV-1 Vpr was a new cargo which utilizes the importin α solely for migration into nuclear, and, in addition, importin β inhibits the nuclear import of Vpr promoted by importin α . We also found that the importin α -dependent nuclear import of Vpr requires not only the interaction with importin α , but also localization at the nuclear envelope. Furthermore, HIV-1 that encoded mutant forms of Vpr that failed to interact with importin- α and localize at the nuclear envelope replicated at drastically reduced rates. Thus, Vpr might be a key regulator of the viral nuclear-import process during infection in macrophages. Next, we found by RT-PCR, RNA protection analysis, and *in vitro* splicing assay, that Vpr caused the accumulation of incompletely spliced forms of α -globin 2 and β -globin pre-mRNAs in cells that had been transiently transfected with a Vpr expression vector. The splicing of intron 1 of α -globin 2 pre-mRNA was effectively inhibited by Vpr but the splicing of intron 2 was unaffected. Thus, it is likely that Vpr contributes to the selective inhibition of the splicing of cellular pre-mRNA. To my knowledge, this is the first report of an HIV-1 protein that leads to inhibition of the splicing of cellular pre-mRNA. Moreover, we found that Vpr also accumulated a 9 kb and a 4 kb class of incompletely spliced HIV-1 RNA in HeLa cells. Vpr changed the variation of *tat* and *rev* mRNA levels but this variation was found not to be due to the effect of Vpr on the *cis*-regulatory element around A3-A4 splice site that generates *tat* and *rev* mRNA. Immunoblot analyses of Env-HA, which is representative of an incompletely spliced RNA, Vpr promoted Env-HA protein synthesis in the presence of Rev. Thus, we found a novel function of Vpr which promotes Rev-RRE dependent nuclear export of HIV-1 RNA and promotes viral protein synthesis.

BLV, which is closely related to human T-cell leukemia viruses types 1 and 2, is the etiologic agent of enzootic bovine leucosis (EBL). We investigated the molecular analysis of influence of host genetic differences on the development of BLV-induced leukemogenesis. We demonstrated that bovine MHC class II DQA1 alleles are associated with resistance or susceptibility to development of BLV-induced bovine lymphoma.

Research Subjects

1. Elucidation of molecular mechanisms of HIV-I-induced AIDS
2. Elucidation of molecular mechanisms of leukemogenesis by human and bovine leukemia viruses

Staff

Head

Dr. Yoko AIDA

Members

Dr. Shin-nosuke TAKESHIMA*

Dr. Yuko KASAHARA-NITAHARA*

Dr. Go MATSUDA*

Dr. Masaaki SATO*

* Contract Researcher

Visiting Members

Dr. Kosuke OKADA (Fac. Agr., Iwate Univ.)

Dr. Shigeru SHIRATORI-TAJIMA (Inst. Natl. Infect. Dis.)

Dr. Wen Zhong ZHUANG (Shandong Acad. Agric. Sci., China)

Trainees

Mr. Daiki AKAMATSU (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)
Ms. Chieko HASHIZUME (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

Ms. Mayu KADO (Tokyo Coll. Med. -Pharm. Technol.)

Mr. Yoshinori KIMATA (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

Mr. Madoka KURAMITSU (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

Mr. Koho MUNETA (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

Mr. Tatsunori SUZUKI (Inst. Biol. Sci., Univ. Tsukuba)

誌 上 発 表 Publications

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Yamanishi K., Pichl L., Kasahara Y. N., and Aida Y.: “Molecular dynamics simulation of lipid-protein ensembles”, *Int. J. of Bioelectromagnetism* (Web) (<http://www.ijbem.org/>) **6**, No. 2, pp. 35–42 (2004). *

Pichl L., Yamanishi K., Kasahara Y. N., and Aida Y.: “Three dimensional space interaction model for HIV-1 accessory protein Vpr and membrane lipid molecules”, *Journal of Three Dimensional Images* **18**, 67–73 (2004). *

Takahashi M., Tajima S., Takeshima S., Konnai S., Yin S. A., Okada K., Davis W. C., and Aida Y.: “Ex vivo survival of peripheral blood mononuclear cells in sheep induced by bovine leukemia virus (BLV) mainly occurs in CD5⁺ B cells that express BLV”, *Microbes Infect.* **6**, 584–595 (2004). *

Iijima S., Kasahara Y. N., Kimata K., Zhuang W., Kamata M., Isogai M., Miwa M., Yokota Y. T., and Aida Y.: “Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4⁺ T cells”, *Virology* **327**, 249–261 (2004). *

Kamata M., Kasahara Y. N., Miyamoto Y., Yoneda Y., and Aida Y.: “Importin- α promotes passage through the nuclear pore complex of human immunodeficiency virus type 1 Vpr”, *J. Virol.* **79**, 3557–3564 (2005). *

Takahashi M., Tajima S., Okada K., Davis W. C., and Aida Y.: “Involvement of bovine leukemia virus in induction and inhibition of apoptosis”, *Microbes Infect.* **7**, 19–28 (2005). *

(総説)

竹嶋伸之輔, 間陽子: “[シリーズ: 異種の MHC] 「ヒツジの MHC」”, *MHC 日本組織適合性学会誌* **11**, 179–187 (2004).

間陽子: “牛白血病ウイルスの潜伏化と白血病発症”, *獣医畜産新報* **57**, 591–593 (2004).

[単行本・Proc.]

(その他)

間陽子: “*bm* 変異系統”, *医学書院 医学大事典*, 伊藤正男, 井村裕夫, 高久史磨 (編), 医学書院, 東京, p. 2022 (2003).

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Aida Y., Miki A., Kado M., and Takeshima S.: “Characterization of bovine MHC (*BoLA*)-*DQA1* and *DQA2* of bovine leukemia virus-infected cattle by using newly established PCR-sequence based typing”, 29th Int. Conf. on Animal Genetics (ISAG 2004), Tokyo, Sept. (2004).

Takeshima S., Kato M., and Aida Y.: “Cloning of cDNAs and molecular evolution of *DO* and *TAP* genes mapped at class IIb region of bovine major histocompatibility complex (*BoLA*)”, 29th Int. Conf. on Animal Genetics (ISAG 2004), Tokyo, Sept. (2004).

Akamatsu D., Takeshima S., and Aida Y.: “Nucleotide sequences and molecular evolution of the bovine major histocompatibility complex (*BoLA*) class I genes”, 29th Int. Conf. on Animal Genetics (ISAG 2004), Tokyo, Sept. (2004).

Aida Y., Iijima S., Kasahara Y. N., Kimata K., and Yokota T. Y.: “Nuclear localization of Vpr is crucial for the efficient replication of HIV-1 in primary CD4⁺T cells”, 4th Awaji Int. Forum on Infection and Immunity, (Institute of Medical Science University of Tokyo, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University and others), Awaji, Sept. (2004).

Aida Y.: “The role of Vpr in replication of HIV-1”, Int. Symp. on 5th AIDS Seminar in Kumamoto, (Center for AIDS Research, Kumamoto University), Kumamoto, Sept. (2004).

(国内会議)

間陽子: “HIV-1 複製のメカニズムを探る”, バイオアーキテクト研究: 平成 15 年度研究交流会, (理研), 和光, 1 月 (2004).

赤松大基, 竹嶋伸之輔, 間陽子: “*BoLA* クラス I 新規対立遺伝子の探索と解析”, 第 137 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 4 月 (2004).

三木晶未, 竹嶋伸之輔, 間陽子: “ウシ主要組織適合遺伝子

- (BoLA) クラス II *DQA* 遺伝子の PCR-Sequence based typing 法の開発”, 第 137 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 4 月 (2004).
- 竹嶋伸之輔, 間陽子: “ウシ主要組織適合抗原クラス II *DOA* および *DOB* 遺伝子の cDNA の単離と解析”, 第 137 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 4 月 (2004).
- 加藤美緒, 竹嶋伸之輔, 間陽子: “ウシ主要組織適合複合体 (MHC) に存在する TAP トランスポーター遺伝子の同定と解析”, 第 137 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 4 月 (2004).
- 高木道浩, 市村香苗, 田島茂, 大橋和彦, 小沼操, 岡田幸助, 間陽子: “ウシ白血病ウイルス感染ヒツジ由来末梢血単核球における NK レセプターとアポトーシス関連因子の発現”, 第 137 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 4 月 (2004).
- 間陽子: “牛白血病ウイルスの潜伏化と白血病発症”, 第 137 回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 4 月 (2004).
- 赤松大基, 竹嶋伸之輔, 間陽子: “ウシ MHC (BoLA) class I 新規アリの単離と解析”, 第 13 回日本組織適合性学会大会, 豊中, 9 月 (2004).
- 竹嶋伸之輔, 間陽子: “ウシ MHC クラス II *DOA* および *DOB* 遺伝子の完全長 cDNA の単離と解析”, 第 13 回日本組織適合性学会大会, 豊中, 9 月 (2004).
- 間陽子, 加藤美緒, 竹嶋伸之輔: “ウシ TAP トランスポーター遺伝子の単離と解析”, 第 13 回日本組織適合性学会大会, 豊中, 9 月 (2004).
- 竹嶋伸之輔, 三木晶未, 加堂真由, 間陽子: “ウシ MHC クラス II *DQA* 遺伝子のタイピング法の開発とそれを用いた牛白血病ウイルス誘発性白血病発症と *DQA* 遺伝子の相関解析”, 第 13 回日本組織適合性学会大会, 豊中, 9 月 (2004).
- 宗田光峰, 笠原-仁田原優子, 橋爪智恵子, 間陽子: “HIV-1 Pre-integration complex (PIC) の構成因子の細胞内局在”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 (2004).
- 倉光球, 橋爪智恵子, 間陽子: “HIV-1 Vpr による pre-mRNA スプライシング反応阻害の解析”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 (2004).
- 松田剛, 間陽子: “HIV-1 Vpr の核移行における Importin7 の影響について”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 (2004).
- 橋爪智恵子, 鈴木辰徳, 倉光球, 間陽子: “HIV-1Vpr と Spliceosome-associated protein (SAP) 145 との結合を介して発揮されるスプライシング反応の阻害機構”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 (2004).
- 木全清典, 倉光球, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: “Vpr によって変化する HIV-1 mRNA 量比の定量解析”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 (2004).
- 笠原-仁田原優子, 飯島沙幸, 横田恭子, 間陽子: “importin α により促進される Vpr 核移行機序の HIV-1 標的細胞を用いた解析”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 (2004).
- 竹嶋伸之輔, 三木晶未, 加堂真由, 間陽子: “地方病性牛白血病発症とウシ MHC クラス II *DQA1* および *DQA2* 遺伝子の相関性の解析”, 第 52 回日本ウイルス学会学術集会, 横浜, 11 月 (2004).
- 木全清典, 倉光球, 我妻昭彦, 横田恭子, 間陽子: “HIV-1 mRNA 量比に及ぼす Vpr の影響の定量解析”, 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 静岡, 12 月 (2004).
- 笠原-仁田原優子, 飯島沙幸, 横田恭子, 間陽子: “importin α を介した Vpr 新規核移行機序の HIV-1 標的細胞を用いた解析”, 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 静岡, 12 月 (2004).
- 橋爪智恵子, 鈴木辰徳, 倉光球, 間陽子: “スプライソソームとの結合を介して起こる HIV-1Vpr のスプライシング阻害反応機構の解析”, 第 18 回日本エイズ学会学術集会・総会, 静岡, 12 月 (2004).