

総説

変異体によるヒト免疫不全ウイルス1型の複製抑制

足立昭夫, 犬伏理津子, 島野玲香

徳島大学医学部ウイルス学教室

(平成10年5月22日受付)

Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by its mutants

Akio Adachi, Ritsuko Inubushi, and Reika Shimano

Department of Virology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima

はじめに

エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス1型 (Human Immunodeficiency Virus type 1 ; HIV-1) が1983年に発見されてから既に10数年が経過した。エイズは人類全体に対する脅威となる非常に重篤な疾患であるだけに、これまで様々な領域の数多くの研究者によって、基礎と臨床の両面から広範な研究が展開されてきた。その結果、HIV-1のウイルス学は遺伝子レベルで相当程度解明され、基本的なパラダイムは形成されたと言って良い状況になりつつある¹⁻⁴⁾。HIV-1に特異的に存在する遺伝子群、すなわち、*tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* と呼称される遺伝子群は注目を浴び、そのウイルス複製に於ける役割、作用機構、さらには、病原性との関連等についてウイルス学史上にない質と量で研究が行われた。しかし、未だ不明の点は数多く残されており、これからも持続的な解明の努力が必要とされるだろう。一方、全てのレトロウイルスに共通して存在する構造遺伝子 *gag*, *pol*, *env* に関しても精力的に研究が行われ、HIV-1研究で初めて明らかにされた事実も多い。これに関してはウイルス感染初期機構についての研究成果が注目されている。今後の主な研究課題は、これら9種の遺伝子群にコードされるウイルス蛋白質の作用機序の分子レベルでの解明である。特に、細胞因子との相互作用が重要であろう。このような研究により、HIVの病原性に関する理解も深まる可能性がある。

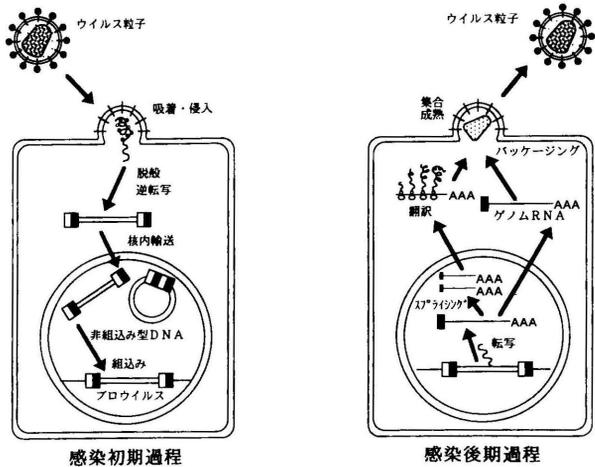
抗エイズ療法に関しては基礎研究ほどの進展がない。ウイルス病の治療法としては、ワクチン療法、化学療法、それに新しい試みとして遺伝子治療があげられる。今の

ところ HIV-1 に効果的であることが臨床の現場で明らかかなものは化学療法だけである。特に多剤併用療法 (逆転写酵素阻害剤・プロテアーゼ阻害剤) の有効性は広く認識されている⁵⁾。しかし、副作用や抵抗性株の出現など問題も多く、他のアプローチも必要不可欠である。抗 HIV-1 ワクチンは安全性や効果に疑問があり今のところ実用の見通しが立たない。遺伝子治療は遺伝子工学の手法に基づく最新の治療法であり⁶⁾、未だ実績は殆ど無いが、エイズという致死性の難病に対処するためには試みる価値がある。本稿では、エイズ遺伝子治療のための抗 HIV-1 遺伝子としてウイルス自身の変異体を取りあげ、その研究成果を概説する。

1. HIV-1 複製の概略

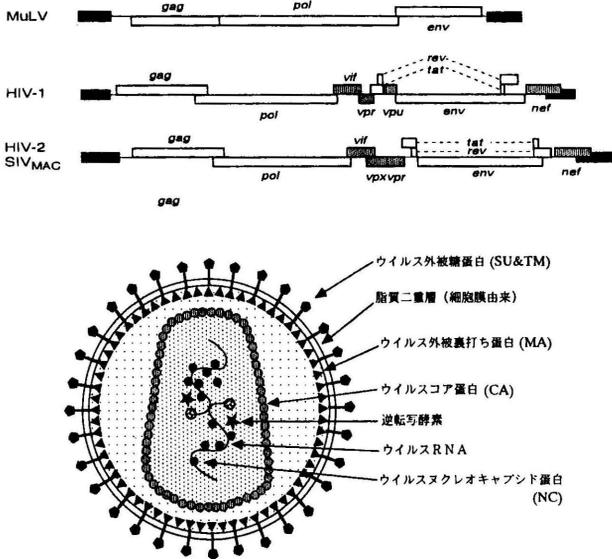
HIV-1 及び1985年に発見された第二のヒトエイズウイルス HIV-2 (アカゲザル由来のサル免疫不全ウイルス SIV_{MAC} と同じウイルス) はレトロウイルスの一員であり、その複製様式は基本的にレトロウイルスのそれと同じである (図1)。ウイルス粒子の細胞への吸着と侵入に始まり、逆転写酵素によるウイルス DNA の合成と、それに続くウイルス DNA の細胞染色体 DNA への組込みまでの初期過程と、組み込まれたプロウイルス DNA の転写、翻訳から子孫ウイルスの細胞外への放出に至る後期 (生合成) 過程の2つに大別される。初期過程の逆転写と組込みという複製様式がレトロウイルスと他のウイルスの主な違いであるが、後期過程で行われる種々の調節・制御機構が HIV-1 を他のレトロウイルスと根本的に異なるものにしていく。HIVのプロウイルスの遺伝子構造をマウス白血病ウイルス (Murine Leukemia

図1 レトロウイルスの生活環。



レトロウイルスの感染サイクルはウイルス粒子の細胞への吸着・侵入に始まり、プロウイルスの生成を経て、子孫ウイルス粒子の放出で終わる。

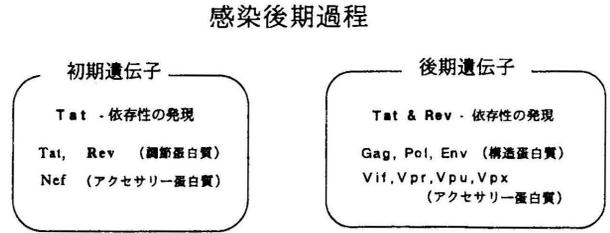
図2 HIV の構造。



HIV プロウイルスの遺伝子構造を上段に HIV 粒子構造を下段に示した。遺伝子構造中、黒箱は LTR を示す。

Virus; MuLV) に代表される単純なレトロウイルスと比較すると HIV の複雑さがよくわかる (図2)。僅か10キロベース程度のゲノムから9個の遺伝子が発現しており、さらに蛋白質のプロセッシングにより15を越える最終産物が産生される。これらには、レトロウイルスに共通する構造蛋白質 Gag, Pol, Env に加えて HIV に特有の Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpx (HIV-2 のみにある), Vpu (HIV-1 のみにある), Nef と呼ばれる蛋白質群がある。現在 Tat と Rev は調節蛋白質 (トランス活性化

図3 感染後期過程に於ける遺伝子発現調節。



Tat と Rev により初期遺伝子群 (3種) と後期遺伝子群 (7種) の発現が調節されている。

因子), その他のものはアクセサリ蛋白質と称されている。HIV 遺伝子の転写から始まる感染後期過程はさらに, Tat 依存性の初期遺伝子群 (*tat*, *rev*, *nef*) の発現と Tat 及び Rev 双方に依存性の後期遺伝子群 (*gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *vpx*) の発現の2つのステップにわけられる (図3)。以下順に簡単に複製の過程を追ってみる (図1)。詳細は文献1-4.を参照されたい。

HIV 粒子は RNA ゲノムと主に構造蛋白質 Gag, Pol, Env から構成されている (図2)。この他 Vpr, Vpx, Vif, Nef もウイルス粒子中に存在する (Vpr と Vpx は量が多い⁴⁾)。ウイルス感染の最初の段階, CD4 レセプターへの吸着・侵入には Env の SU (surface) 糖蛋白質 (gp120) と TM (transmembrane) 糖蛋白質 (gp41) が働く。Pol の逆転写酵素, リボヌクレアーゼ H, インテグラーゼにより, ウイルス DNA 合成から細胞染色体への組み込みが行われ初期過程が完了する (プロウイルスの生成)。このプロウイルスからウイルス遺伝子の発現が起こる。この過程に必須のウイルス蛋白質が Tat であり, 全ウイルス遺伝子のスイッチ役を果たしている。Tat は HIV プロウイルスの LTR (long terminal repeat; 転写の開始や終結等のためのシグナル配列が存在する) に働いて, その転写活性を飛躍的に増大させる。Tat の働きによりまず発現してくるのが, Rev と Nef である。Nef の機能の詳細は不明だが, Rev は残りの全ウイルス蛋白質 (構造蛋白質及び Nef を除くアクセサリ蛋白質) の発現に必須の機能を有している。Rev はウイルス mRNA 上にある特定の配列に結合し, その mRNA を効率良く核から細胞質に輸送する。その結果, その配列を持つ mRNA (後期遺伝子群の mRNA) は効率良くウイルス蛋白質へと翻訳されることになる。Gag 及び Env は前駆体として合成され, 後にプロテアーゼの働きにより成熟ウイルス蛋白質が生成される。Gag 前駆体の開裂には自身のプロテアーゼ (Pol の1つ) が, また Env 前

駆体の開裂には宿主細胞由来プロテアーゼが使われる。さらに、リボソームフレームシフトにより合成される Gag-Pol 前駆体からウイルスプロテアーゼにより 4 種の Pol (いずれも酵素) が生成する。ウイルス粒子の成熟は感染後期過程の最終段階で起こる。Vpr と Vpx を除く (Vpr のウイルス複製に対する役割は全く不明であるし、Vpx は感染初期に働くと考えられている) 全てのアクセサリ蛋白質はこの後期過程で働いて、結果的にウイルス複製を正に制御している。Vif は Gag あるいは Env に作用し、何らかのメカニズムで子孫ウイルス粒子の感染性を高める。Vpu はウイルス複製の最後の段階、子孫ウイルス粒子の放出、の効率を上昇させる。最後に Nef であるが、現在エイズ発症との関係で最も注目されている HIV 蛋白質である。Nef は何らかのメカニズムでウイルス粒子を修飾し、結果として粒子の感染価が上昇する。

2. ドミナントネガティブ (dominant negative) 変異体

HIV 遺伝子に関する変異体は我々を含め多くの研究グループが多数作製している⁷⁾。これらはウイルス蛋白質の機能を詳細に解析するための分子遺伝学的研究に用いられたものである。トランスフェクションにより感染性ウイルスを産生する完全な分子クローンに種々の変異 (塩基置換, 欠失, 挿入) を試験管内で導入し、得られた変異体の表現型を解析することにより元の遺伝子の機能を推定する手法である。当然、解析法は分子生物学的なもので、標的蛋白質の作用機序, 作用点などを疑問の余地なく解明し得る。HIV に関する知見の非常に多くがこの分子遺伝学的研究により得られている。HIV のウイルス学の理解に必須であった変異体であるが、その作用を詳しく調べていくうちに、野生株の複製をドミナントに抑制する (dominant negative) ものが多数あることがわかってきた。効率の良いドミナントネガティブ変異は、結合部位と活性部位とがありマルチマー (multimer) 構造の蛋白質に生じやすい。この種の変異体は蛋白質の機能の解明に関して極めて強力な武器となる。他の蛋白質や正常の蛋白質と結合は出来るが活性がない変異体で、さらにモノマーが多数集合した形のマルチマー蛋白質の変異体であれば、発現レベルが低くても正常蛋白質に対してネガティブな効果が期待できる。従って、図 2 の粒子構造からもわかるように、HIV-1 の Gag や Env はドミナントネガティブ変異の理想的な

ターゲットである。実際、HIV-1 蛋白質でドミナントネガティブ変異体の報告があるのは、Gag, Pol, Env, Tat, 及び Rev である⁷⁻¹⁵⁾。Gag ではマトリックス (MA) とキャプシド (CA) 変異体⁸⁻¹⁰⁾、Pol ではプロテアーゼ変異体¹¹⁾、Env では膜貫通蛋白質 TM 変異体^{7,12)}が効果的に野生株の複製を抑制する。実験で比較されているわけではないが報告されているデータから、Tat, Rev 及び Pol のドミナントネガティブ変異体は Gag や Env のドミナントネガティブ変異体より効果が弱く¹²⁻¹⁵⁾、Env のドミナントネガティブ変異体は Gag のドミナントネガティブ変異体より弱い活性を示す⁷⁾と考えられる。

3. Gag と Env のドミナントネガティブ変異体

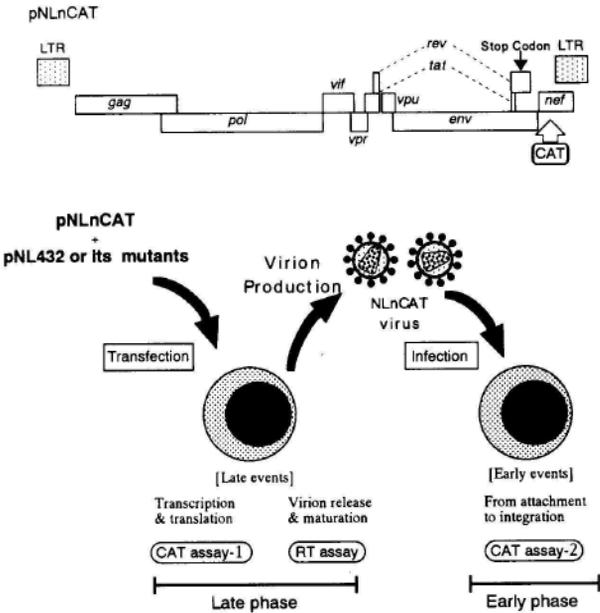
我々はこれまでに作製した一連の HIV-1 変異体の一部 (表 1) を使い、その一複製サイクルにおけるドミナント

表 1. ドミナントネガティブ効果を検証した HIV-1 変異体

変異体	変異部位	ドミナントネガティブ効果
M1a	<i>gag</i> -MA	無
M1b	<i>gag</i> -MA	有
M2a	<i>gag</i> -MA	無
M2b	<i>gag</i> -MA	無
M3a	<i>gag</i> -MA	無
M3b	<i>gag</i> -MA	無
C1a	<i>gag</i> -CA	有
C1b	<i>gag</i> -CA	有
C2a	<i>gag</i> -CA	有
C2b	<i>gag</i> -CA	有
C3a	<i>gag</i> -CA	無
C3b	<i>gag</i> -CA	有
C4a	<i>gag</i> -CA	有
C4b	<i>gag</i> -CA	有
C5a	<i>gag</i> -CA	有
C5b	<i>gag</i> -CA	有
C6a	<i>gag</i> -CA	有
C6b	<i>gag</i> -CA	有
N1a	<i>gag</i> -NC	無
N1b	<i>gag</i> -NC	無
Hc	<i>pol</i> -pro	無
Ps2	<i>pol</i> -RT	無
B1	<i>pol</i> -endo	無
Af1	<i>pol</i> -endo	無
Nd	<i>vif</i>	無
Af2	<i>vpr</i>	無
Ec	<i>vpr</i>	無
S1	<i>vpr</i>	無
dBM	<i>tat</i>	無
Ss	<i>vpu</i>	無
Kp	<i>env</i> -SU	無
St	<i>env</i> -SU	無
Hi	<i>env</i> -TM	有
Ba	<i>env</i> -TM, <i>rev</i>	無
Hp	<i>env</i> -TM	無
Xh	<i>nef</i>	無

pro, protease; RT, reverse transcriptase; endo, endonuclease; SU, surface; TM, transmembrane. 結果については、図 5 参照。

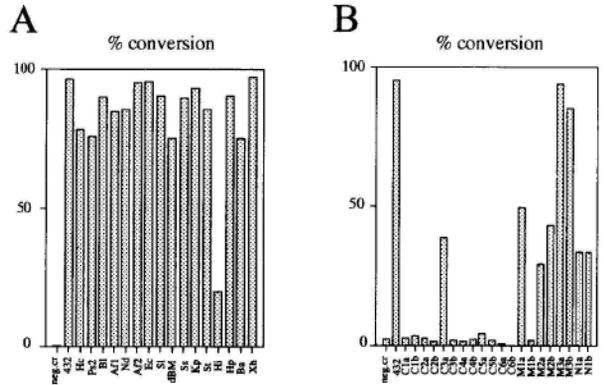
図4 シングルラウンドレプリケーションアッセイ法。



HIV 変異体の欠損部位をウイルス複製サイクル中にマップするシステム。複製欠損性マーカークローン (pNLnCAT) と完全長プロウイルスクローン (野生株 pNL432あるいは変異体) を利用し、トランスフェクションと CAT ウイルスの感染実験で変異体の欠損部位を同定し、目的の遺伝子の産物の作用部位を明らかにする。CAT assay-1, RT (reverse transcriptase) assay, CAT assay-2 の値を野生株と比較することで、変異体の複製過程の効率が測定できる。CAT, chloramphenicol acetyltransferase.

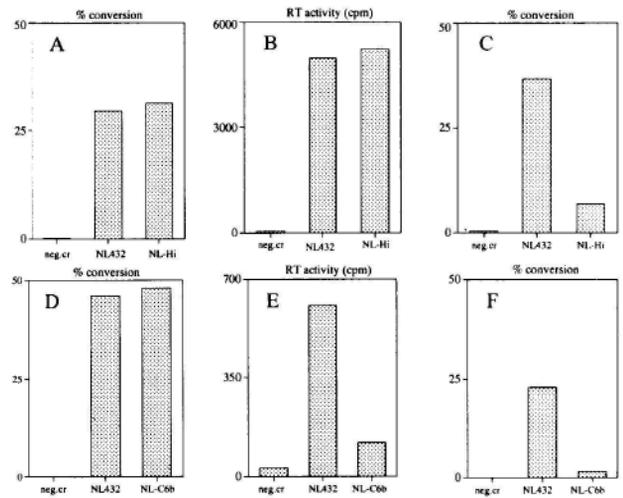
トネガティブ効果を系統的に検証した^{7,9)}。検証に用いたシステムは我々が開発したシングルラウンドレプリケーションアッセイ法 (図4) で、ウイルス複製サイクル (図1) における変異体の欠損の程度を初期 (ウイルスの細胞への吸着・侵入からウイルス DNA の細胞染色体 DNA への組込まで) と後期 (プロウイルスからの転写・翻訳から細胞外へのウイルス粒子放出まで) に分けて、あるいはまた、トータルに定量できる¹⁶⁾。このシステムにより、gag 変異体を中心に全ての遺伝子をカバーする合計36の変異体を調べた。マーカーとなる完全長のクローン (pNLnCAT) と各種変異体を同時にトランスフェクションすることで正常のウイルス蛋白質と変異体蛋白質を同時に細胞内で存在させる。図4にあるように、このウイルスサンプルを CD4 陽性細胞に感染させ一定時間後にマーカー酵素の活性を測定すれば、変異体の野生株に対する効果が容易に定量出来る。なお、rev 変異体と nef 変異体に関しては別のマーカークローン (Rev と Nef を発現できる複製欠損性マーカークローン pNLenvCAT¹⁷⁾) を使用した。スクリーニングの結果、野生株に対して明らかに抑制効果を示したものが13あ

図5 変異体による HIV-1 複製阻害効果。



A には gag 変異体以外⁷⁾B には gag 変異体⁹⁾の結果をまとめた。変異体の名称については表1参照。トランスフェクションで得られた CAT ウイルスサンプルを同量用いて CD4 陽性細胞に感染させ、図4の CAT assay-2 で複製効率を比較した^{7),9)}。neg.cr, 陰性コントロール; 432, 野生株。クロラムフェニコールのアセチル化率で表示。常に陽性コントロールの20%以下の値を示すものを阻害有りとした。

図6 変異体の複製サイクルにおける阻害作用点。



シングルラウンドレプリケーションアッセイ法 (図4) で表1の変異体 Hi (A-C) と C6b (D-F) の阻害効果が認められるステップを決定した^{7),9)}。左から、複製後期の CAT アッセイ, RT アッセイ, 及び複製初期の CAT アッセイ。neg.cr, 陰性コントロール; NL432, 野生株。RT は³²P のカウント, CAT はクロラムフェニコールのアセチル化率で表示。

た (図5)。gag 変異体12種と env 変異体1種である。作製した Gag-CA 変異体は殆ど抑制効果を示したのに対し、他の領域の Gag 変異体は Gag-MA 1種のみが野生株複製を阻害した。Env-TM 変異体 Hi の抑制効果は明らかに Gag-CA 変異体 C6b のそれより劣った。次に、これら変異体が感染サイクルのどの段階で野生株の複製を阻害するかを再びシングルラウンドレプリケーション

アッセイ法 (図4) で検討してみた。図6から明らかのように, Gag-CA 変異体 C6b の抑制効果は初期と後期に認められ, Env-TM 変異体 Hi は初期のみであった。ドミナントネガティブ Gag-CA 変異体の中には後期過程にはあまり欠損のないものもあるので¹⁸⁾, 初期過程だけに抑制効果を示す変異体もあるかもしれない。これらの変異体による野生株複製抑制過程をさらに詳しくするため, 初期過程ではウイルスの細胞へのエントリー及びウイルス DNA 合成の程度, 後期過程ではウイルス蛋白質の合成パターンを検討した。その結果, C6b はウイルス DNA 合成かそれ以前の過程及び Gag 前駆体の開裂過程に作用すること¹⁰⁾, Hi はウイルスの細胞への侵入過程に働くこと⁷⁾が明らかになった。HIV-1 が感染した時のみ Gag-CA C6b 変異体を発現する CD4 陽性細胞株を作製し, HIV-1 感染実験を行ったところ, ウイルスは全く増殖出来なかった⁹⁾。

これまでに述べた種々の成績から, トランスドミナントネガティブ変異を持つ HIV-1 遺伝子は Baltimore の提唱する細胞内免疫法¹⁹⁾に使用できる。この遺伝子を持つ細胞は全て HIV-1 に対して抵抗性になる^{9, 15, 20-23)}からである。

おわりに

臨床の現場で具体的な成果はあがっていないものの, 少なくとも実験室レベルでは抗 HIV-1 遺伝子治療は確実に有効である。ここで紹介したウイルス遺伝子変異体の他に抗 HIV-1 遺伝子治療として, RNA デコイ (decoy), リボザイム (ribozyme), アンチセンス RNA などが試されているが, それほど際だった効果はないと思われる。また, 細胞側の遺伝子産物, 例えば HIV-1 に対するレセプター, を利用することも行われているが, これも実用的ではない。従って, ドミナントネガティブ HIV-1 遺伝子変異体が現時点では最も有望であろう。しかしながら, 非常に多くの困難な課題が残されたままである。どのような細胞にどのような手段で特異的に抗 HIV-1 遺伝子を導入すれば良いのか, 十分な発現量 (発現細胞数及び細胞あたりの量) を個体内で確保できるのか, などである。動物実験なしには解答は得られないと思われるが, HIV-1 の狭い宿主域のために未だ適当なシステムがない。多くの基礎研究が必要である。

謝 辞

本稿の執筆に当たり, 協力頂いた吉田和子, 大島陽子

の両氏に深謝したい。

文 献

1. 足立昭夫, 川村名子: HIV 複製の分子基盤. 医学のあゆみ, 176: 17-23, 1996
2. 足立昭夫, 山本善彦, 曾根三郎: HIV の複製機構. ウイルス, 46: 145-154, 1996
3. 川村名子, 徳永研三, 足立昭夫: ヒト免疫不全ウイルス (HIV) のアクセサリー遺伝子. 細胞工学, 14: 565-569, 1995
4. 徳永研三, 古田里佳, 川村名子, 足立昭夫: ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の制御遺伝子の機能. 蛋白質核酸酵素, 40: 1079-1091, 1995
5. Confronting HIV98 no.7, スタンダード・マッキンタイヤ, 東京, 1998
6. 島田隆: 遺伝子治療—現状と課題. HIV/AIDS 研究は今 基礎研究の現場から (第11回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会 編), クバプロ, 東京, 1997
7. Inubushi, R., Shimano, R., Oshima, Y., and Adachi, A.: The potential of various HIV-1 mutants to inhibit the replication of wild-type virus. Biochem. Biophys. Res. Commun., 247: 349-352, 1998
8. Trono, D., Feinberg, M.B., and Baltimore, D.: HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. Cell, 59: 113-120, 1989
9. Furuta, R.A., Shimano, R., Ogasawara, T., Inubushi, R., et al.: HIV-1 capsid mutants inhibit the replication of wild-type virus at both early and late infection phases. FEBS Lett., 415: 231-234, 1997
10. Shimano, R., Iida, S., Fukumori, T., Yamamoto, Y., et al.: Inhibition of HIV replication by capsid mutant C6b. Biochem. Biophys. Res. Commun., 242: 313-316, 1998
11. Baba, L.M., Rose, J., and Craik, C.S.: Trans-dominant inhibitory human immunodeficiency virus type 1 protease monomers prevent protease activation and virion maturation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 10069-10073, 1995
12. Freed E.O., Delwart, E.L., Buchsacher, G. J. Jr., and Panganiban, A.T.: A mutation in the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41 dominantly interferes with fusion and infectivity.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 70-74, 1992
13. Green, M., Ishino, M., and Loewenstein, P.M. : Mutational analysis of HIV-1 Tat minimal domain peptides : identification of trans-dominant mutants that suppress HIV-1-LTR-driven gene expression. *Cell*, 58 : 215-223, 1989
 14. Malim, M.H., Bohnlein, S., Hauber, J., and Cullen, B. R. : Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator-derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell*, 58 : 205-214, 1989
 15. Furuta, R.A., Kubota, S., Maki, M., Miyazaki, Y., et al. : Use of a human immunodeficiency virus type 1 Rev mutant without nucleolar dysfunction as a candidate for potential AIDS therapy. *J. Virol.*, 69 : 1591-1599, 1995
 16. Adachi, A., Kawamura, M., Tokunaga, K., and Sakai, H. : Methods for HIV/SIV gene analysis. In : *Viral Genome Methods* (Adolph, K.W., ed.), CRC Press, F. L., 1996, pp. 43-53
 17. Shibata, R., Sakai, H., Kawamura, M., Tokunaga, K., et al. : Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells. *J. Gen. Virol.*, 76 : 2723-2730, 1995
 18. Kawamura, M., Shimano, R., Inubushi, R., Amano, K., et al. : Functional domain mapping of HIV-1 Gag proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241 : 317-320, 1997
 19. Baltimore, D. : Intracellular immunization. *Nature*, 335 : 395-396, 1988
 20. Buchschacher, G.L.Jr., Freed, E.O., and Panganiban, A.T. : Cells induced to express a human immunodeficiency virus type 1 envelope gene mutant inhibit the spread of wild-type virus. *Hum. Gene Ther.*, 3 : 391-397, 1992
 21. Vandendriessche, T., Chuah, M.K., Chiang, L., Chang, H.K., et al. : Inhibition of clinical human immunodeficiency virus (HIV) type 1 isolates in primary CD 4 + T lymphocytes by retroviral vectors expressing anti-HIV genes. *J. Virol.*, 69 : 4045-4052, 1995
 22. Woffendin, C., Ranga, U., Yang, Z., Xu, L., et al. : Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93 : 2889-2894, 1996
 23. Plavec, I., Agarwal, M., Ho, K.E., Pineda, M., et al. : High transdominant Rev10protein levels are required to inhibit HIV-1 replication in cell lines and primary T cells : implication for gene therapy. *Gene Ther.*, 4 : 128-139, 1997

SUMMARY

Various mutants of human immunodeficiency type 1 (HIV-1) were systematically analyzed with respect to their ability to suppress the replication of wild-type (wt) HIV-1. A total of thirty-six mutants of all nine HIV-1 genes were evaluated for their inhibitory effects in a single-round of viral replication cycle. Some of the *gag* and *env* mutants were found to be efficiently interfere with the replication of wt HIV-1. The effective sites were mapped to early and/or late viral replication phase. These mutants are useful for future gene therapy against HIV-1 disease AIDS.

Key words : HIV-1, Gag, Env, gene therapy