

# ヒト免疫不全ウイルス HIV の分子遺伝学

大島 陽子, 足立 昭夫

徳島大学医学部ウイルス学教室

(平成11年9月16日受付)

## はじめに

ウイルス研究には100年程の歴史がある。この100年の間に、ウイルスの性質及びウイルス病に関する膨大な知識が蓄積されてきた。ウイルス研究の第一義の目的は、ウイルス病を診断し、予防治療することにある。一方、ウイルス研究は基本的な生命現象を理解する上でも大きく貢献してきた。近年の分子生物学の爆発的な発展もウイルス研究なくしてはあり得なかつたであろう。ヒト免疫不全ウイルス HIV (Human Immunodeficiency Virus) 研究は、このウイルス学研究の歴史を非常に短時間で再現したものであるということが出来る。1983年の発見からわずか10数年間で HIV の生物学はほぼ解明されたと言ってもよいかもしれない。しかし、肝心のエイズ発症機序や予防・治療に関しては未だ未解決の問題が多い。また、HIV に固有のアクセサリ-蛋白質の作用機構など意外に基本的なことも解明されていない。本稿ではウイルス学教室で行なわれている HIV 研究を平易に解説することで、エイズ研究の現在の問題点を明らかにしてみたい。

## 1. HIV の分子遺伝学的研究

ヒトに感染するレトロウイルスには3種類ある(図1)。HIV, HTLV (Human T-cell Leukemia Virus) と HFV (Human Foamy Virus) である。図1に示したように HFV 以外はヒトに対する病原性が明らかにされており、それぞれその発症機構の解明や予防/治療を目指した研究が進められている。エイズの病原体である HIV/SIV (Simian Immunodeficiency Virus) はヒトと種々のサルから分離されているが(図2)、特に HIV-1 は全世界に蔓延して人類全体に対する脅威となっている。我々は1983年の HIV-1 発見の2年後から HIV 研究をスター

図1 ヒトレトロウイルスの病原性と研究テーマ

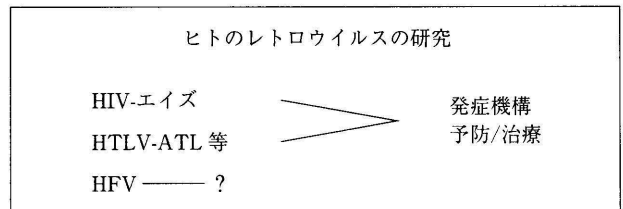
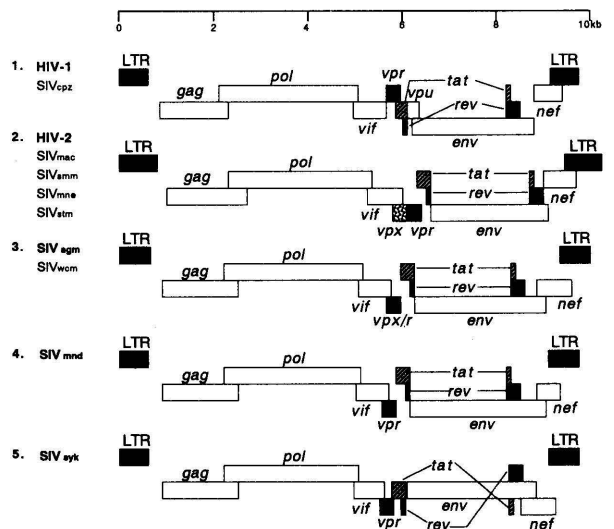


図2 種々の HIV/SIV プロウイルスの遺伝子構造



*gag, pol, env* は構造遺伝子, *tat* と *rev* は調節遺伝子, *vif, vpx, vpr, vpu* と *nef* はアクセサリ-遺伝子と呼称される。構造遺伝子, 調節遺伝子は全ての細胞系においてウイルス複製に必須である。

トさせた。研究手法は感染性分子クローン<sup>1)</sup>を用いる分子遺伝学である(図3)。

### 1) アクセサリ-蛋白質群

完全長の HIV 分子クローンを用いて最初に調べたのはある遺伝子産物とウイルス複製能の関係である<sup>2,3)</sup>。

図3 HIV の分子遺伝学的研究

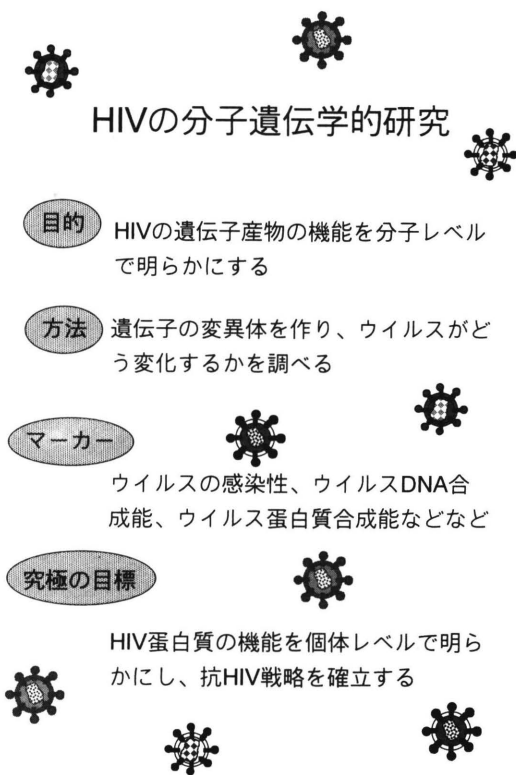
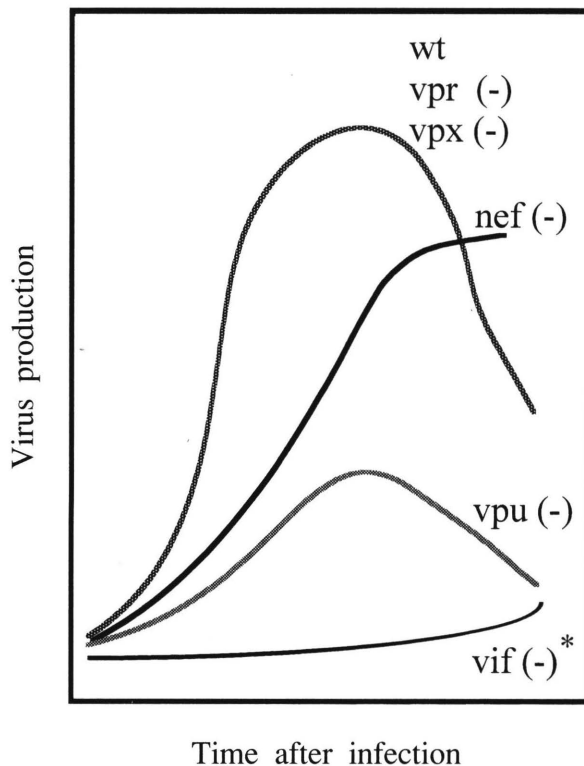


図4 HIV アクセサリー蛋白質変異体の増殖曲線



株化細胞での変異体の増殖曲線を模式的に示した。一般に、Vif 変異体は最も増殖がわるく、株化細胞でも H9 や MT-2 細胞では増殖不能である。

意外なことに、株化細胞を用いると HIV の10個の遺伝子のうち、実に5個がアクセサリー遺伝子だったのである（その遺伝子がなくてもウイルスは複製可能であるという意味）(図4)。その後、自然宿主細胞である PBMC（末梢血単核細胞）やマクロファージで図4と同様の実験が行なわれ、Vif と Vpx は細胞によってはウイルス複製に必須<sup>4)</sup>であることがわかったが、Vpr、Vpu と Nef は程度の差はあるものの必須ではない。細胞によるこれらアクセサリー蛋白質の要求性の差が何によるのかは依然として明らかでない。次に、野性株と変異体で明確に差が認められる細胞系を用い、我々の開発したシングルラウンドレプリケーションアッセイ (Single-round Replication Assay; SRA) 法<sup>5,6)</sup>で各アクセサリー蛋白質のウイルス複製サイクルにおける作用点を検討した。表1にまとめてあるように、適当な細胞系がない Vpr を除いた全てのアクセサリー蛋白質で作用点が同定され、主な機能もほとんど明らかにされた。残るはその機能に関連する細胞因子の同定を含めた、アクセサリー蛋白質の作用機序の分子レベルでの解明である。Vpr は現在、そのアポトーシス制御能など細胞増殖との関係が注目されている<sup>7)</sup>。

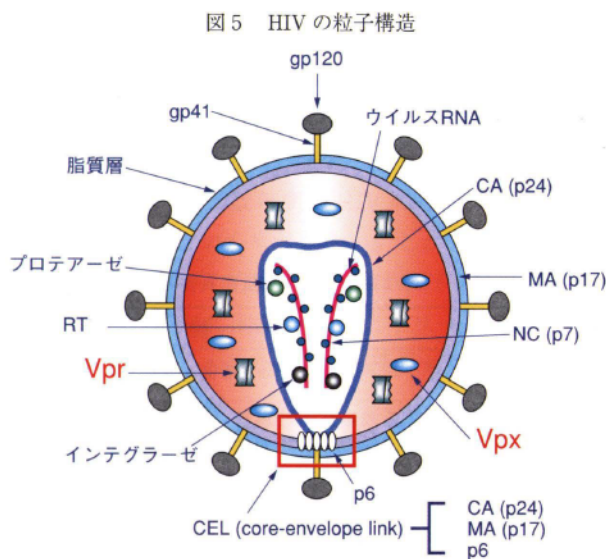
表1 HIV アクセサリー蛋白質の機能

蛋白質	作用点	機能
Vif	初期	ウイルス DNA 合成を増強する。
Vpr	初期?	組込み前駆体の核移行シグナルとして働く。細胞周期を G2 期でとめる。アポトーシスを制御する。
Vpx	初期	ウイルス DNA 合成を増強する。
Vpu	後期	細胞からのウイルス粒子放出を増強する。
Nef	初期	ウイルス粒子の細胞への侵入効率及びウイルス DNA 合成を増強する。CD4 や MHC-I の発現を抑制する。その他種々の報告がある。

## 2) Gag 蛋白質

図5に模式的に示したように、HIV 粒子の主な構成成分は4種のGag蛋白質(マトリックス蛋白質MA, キャプシド蛋白質CA, ヌクレオキャプシド蛋白質NC, p6)である。HIVの生物学的性格にGagが大きく関わっているのは当然であり、アクセサリー蛋白質や細胞因子との重要な相互作用も充分予想される。我々もGagの

点変異体を多数作製し、SRA 法などでその機能を解析した<sup>8,9)</sup>。表2に我々の成果を含め現在までに報告されている結果をまとめた。予想通り Gag はウイルス複製サイクルの全般にわたって極めて重要な役割を果たし、当然 HIV 複製に必須である<sup>10)</sup>。ウイルス遺伝子の脱殻/逆転写 (細胞因子も関わっている)、ウイルス粒子の形成/放出、アクセサリ-蛋白質との相互作用など、複製の初期から最終段階にいたるまで、Gag 機能は常に要求されている。Gag はこのようにウイルス複製にクリティカルであり、さらにウイルス粒子は構造的に Gag のマルチマー (multimer) であるので、点変異体のなかには野性株の機能を効率良く抑制するものがあることが予想された。SRA 法を利用して種々の Gag 変異体の抑制能を検討したところ、CA 変異体を中心に、MA 変異体や p6 変異体にも野性株の複製を強く阻害するものがあった<sup>8,11)</sup> (図6)。抑制の作用点もウイルス複製の初



HIV ウイルス粒子を模式的に示した。分子量は HIV-1 のもの。Vpx は HIV-1 にはない (図2 参照)。RT, 逆転写酵素。

表2 HIV Gag 蛋白質の機能

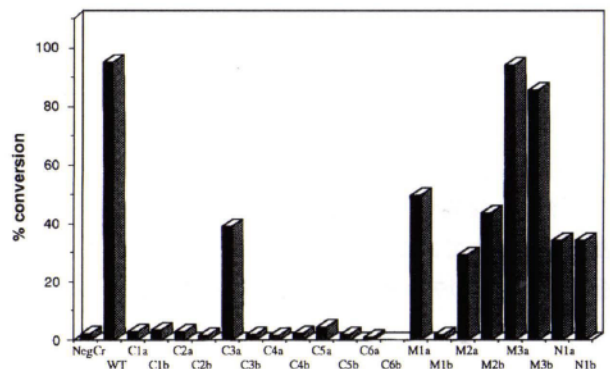
蛋白質	作用点	機能
MA	初期, 後期	脱殻/逆転写, ウイルス粒子形成
CA	初期, 後期	脱殻/逆転写, ウイルス粒子形成
NC	初期	脱殻/逆転写
p6	後期	ウイルス粒子放出, Vpr/Vpx のウイルス粒子へのターゲッティング

期と後期過程の両方にあり<sup>8,12)</sup>、また、阻害効率も今まで知られている HIV 抑制蛋白質で最大であった<sup>13)</sup>。

### 3) SHIV の作製

HIV-1 と他の HIV-2/SIV との最も大きなウイルス学的違いはその狭い宿主域である。エイズの主要病原体である HIV-1 はヒトとチンパンジーにしか感染せず、チンパンジーではヒトの場合のようにエイズを発症させない。本当の意味で HIV-1 に類似したウイルスはサル以外の動物種では見つかっていない。従って、自然に存在する動物実験システムで良いエイズモデルは存在しないと見える。しかし、HIV-1 研究では上記の細胞レベルでの研究に加えて個体レベルでの研究が必須である (図7)。アクセサリ-蛋白質の機能は個体レベルでなければ理解できないことも多く (表1)、さらに、エイズという疾病の解明、制御のためには動物実験が不可欠だからである。HIV-1 動物実験のために我々はサルに感染できる HIV-1 キメラウイルスを作製することにした (図8)。サルに感染する SIV と HIV-1 との間で遺伝子組換えウイルスを多数作り (図9)、それらのウイルスのサル PBMC での増殖能を丹念に調べた。その結果、NM-3 と呼称されたキメラウイルスがサル PBMC で良く増殖することがわかった<sup>14)</sup> (図10)。NM-3 はサルにも感染する<sup>15)</sup>。この成果を基に、世界中で研究が行なわれ、現在では、キメラウイルスでサルにエイズを発症させ得ること、gag 遺伝子が SIV 由来であればキメラウイルスは SIV と同じ広いトロピズムを示すことが

図6 Gag 変異体による HIV-1 複製阻害効果

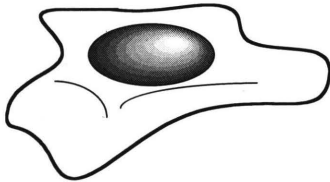


野性株 (WT) の通常の複製 (single-round replication) を100とした時、変異体存在下での複製効率を示す<sup>8,9)</sup>。p6 変異体 (2種類) のデータは示していないが強い抑制効果がある<sup>11)</sup>。NegCr, 陰性コントロール。C は CA 変異体, M は MA 変異体, N は NC 変異体を示す。

図7 個体レベルでの HIV 研究



細胞レベル



個体レベル

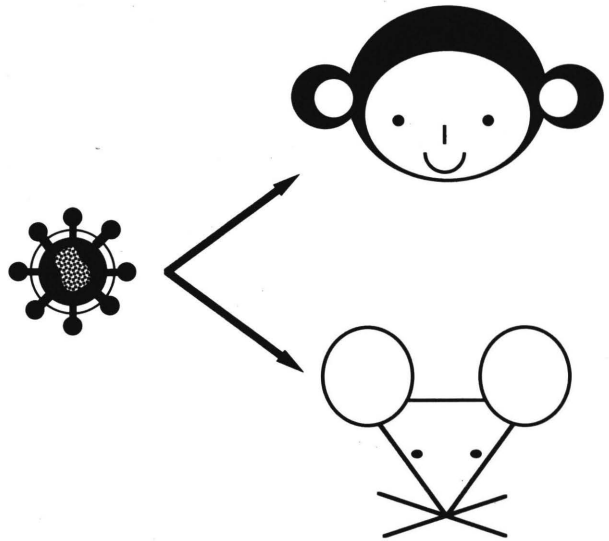
SIV SHIV



HIV のウイルス学的研究には個体レベルでの実験が必要不可欠だが、今のところ SIV (HIV 類似ウイルス) や SHIV (SIV と HIV 間のキメラウイルス) を使うサルが最も有用である。

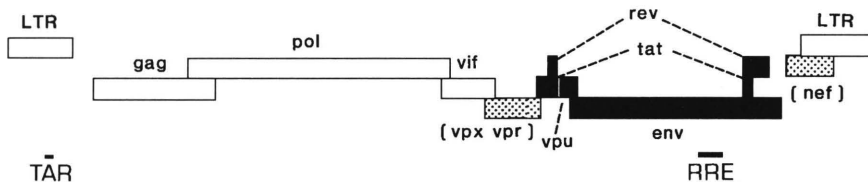
図8 HIV の動物実験

# ウイルスを変える 動物を変える



HIV 動物実験を意味のあるものにするためにはウイルスあるいは宿主 (マウスなどの小動物が望ましい) を改変する必要がある。

図9 HIV/SIV キメラウイルスの遺伝子構造

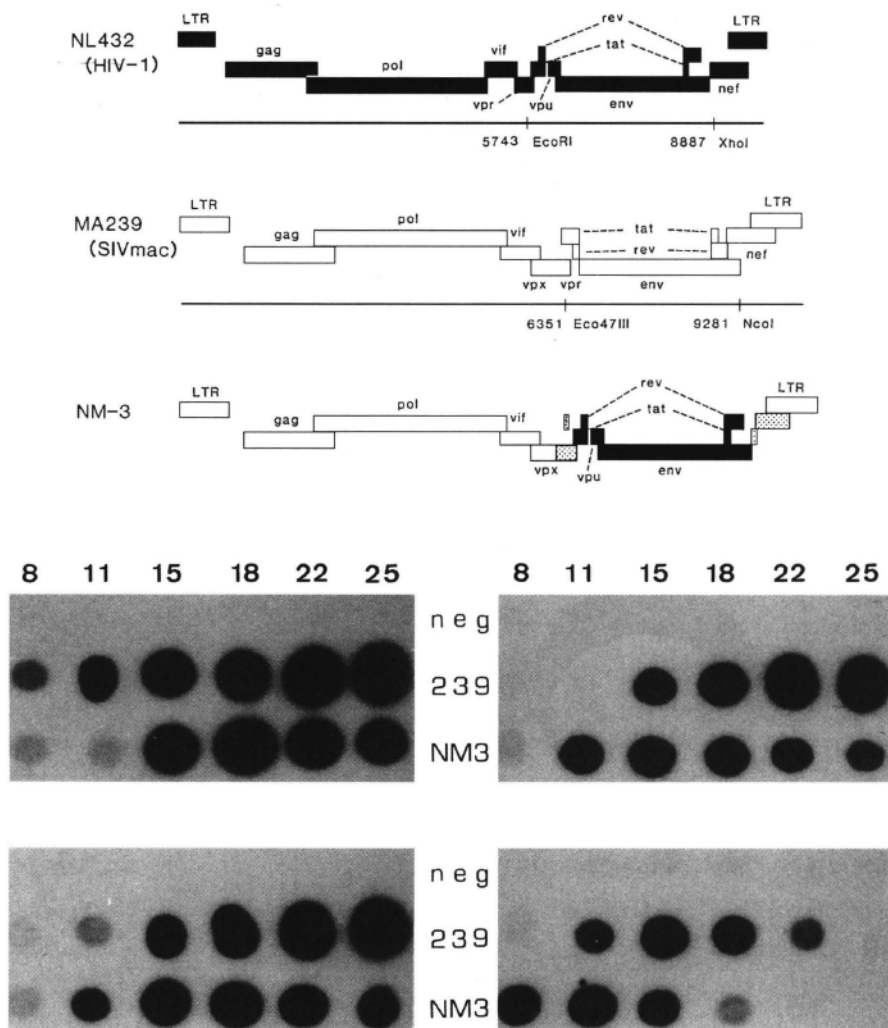


アクセサリ-遺伝子内で2種類のウイルス (白箱と黒箱) を組換えたものを示す。組換えたアクセサリ-遺伝子は灰箱で示した。このキメラウイルスを基に多数の組換え体を作製した。TAR, Trans-Acting Responsive element; RRE, Rev Responsive Element.

わかっている。だがしかし、サルはやはり実験動物として扱いにくく、特別の施設でしか研究ができない。マウスなどの小動物をエイズ動物モデルとして使うのが理想であろう(図8)。HIV-1 の細胞レセプター(ヒト由来) をマウスに導入したり、SCID マウスを利用するなどの試みはあるが、今のところ満足すべきマウスモデルはな

い。感染モデルは無理としても、エイズの病態モデルの樹立は可能かも知れない。今後この方面の研究がますます重要になるだろう。

図10 サル PBMC で増殖可能な SHIV の構造



上部の組換え体の遺伝子構造は図9と同じ表示法である。下部は4頭のカニクイザルからPBMCを調整し、ウイルス感染後(8日から25日)のウイルス産生量をRTで測定した結果を示す。NM-3と名付けられたキメラウイルスがサルPBMCで親株のSIV(239)と同等かそれ以上に良く増殖した。データは示していないが、HIV-1(NL432)は全く増殖できない。neg, 陰性コントロール。

## 2. 抗 HIV 戦略

現在考えられている抗 HIV 戦略は表3にまとめられているとおりである<sup>13)</sup>。臨床の現場では、表3の化学療法、ワクチン療法、遺伝子治療のうち、化学療法だけが抗 HIV として有効であることが実証されている。逆転写酵素阻害剤/プロテアーゼ阻害剤を用いた多剤併用療法は特に有効である。しかし、副作用や耐性ウイルスの出現などの問題は大きく未だ未解決である。ワクチンは Env に焦点が絞られているが、その効果や安全性に疑

表3 抗 HIV 戦略

化学療法	逆転写酵素阻害剤, プロテアーゼ阻害剤, 両剤併用
ワクチン	Env サブユニットワクチン, ウイルス生ワクチン, ウイルス不活化ワクチン, 遺伝子組換えワクチン
遺伝子治療	ウイルス蛋白質変異体, リボザイム, アンチセンス RNA, DNA ワクチン

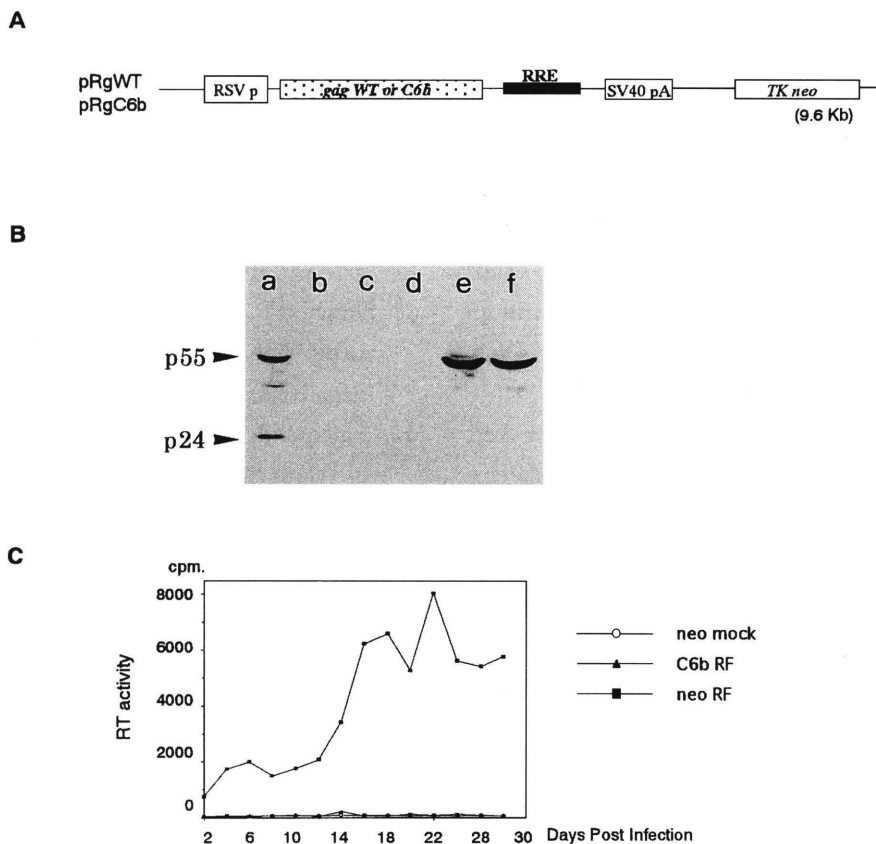
間がある。最後に、遺伝子治療であるが、感染症に対しては全く実績がなくその効果は未知数である。しかしながら、遺伝子治療は遺伝子工学の手法に基づく新しい治療法であり、エイズという致命的難病に対処するためには試みる価値がある。ここでは我々の行なった Gag 変異体導入細胞の抗 HIV-1 効果を簡単に紹介したい<sup>8)</sup>。変異 gag 遺伝子は図 6 の C6b で、CA が僅かだけ変異している。HIV-1 が感染した時のみこの変異 CA が発現する T 細胞は完全に HIV-1 に抵抗性となる (図 11)。つまり、通常は変異 CA が発現せず、ウイルス感染によって僅かにそれが発現するだけの細胞でウイルス増殖が完全に阻害されるのである。変異 CA を導入する細胞を適当な造血幹細胞にすれば十分な抗 HIV 効果が期待され

る (細胞内免疫法)。もちろん、遺伝子の導入効率、効果の持続性など様々な問題点がある。これらを実験的に検討するためには、上記の動物モデルの確立がぜひ必要である。

おわりに

HIV 研究は多方面にわたる学問領域を包含している。単に一つのウイルスの研究にとどまらず、医学、薬学、分子生物学、生化学、免疫学、社会学等の総合的学問領域である。我々の研究室で行なわれている研究はそのうちのごく僅かではあるが、それでもなお幅広い知識、技術手法、概念が要求されている。エイズ研究は大いに進

図 11 変異 Gag 発現細胞での HIV-1 の増殖



(A) に Gag 発現ベクターの構造, (B) に (A) のベクターをトランスフェクトした細胞中の Gag 発現をウェスタン法で調べた結果, (C) に (A) の変異 gag を導入した T 細胞株での HIV-1 RF ウイルスの増殖曲線を示した。RRE をベクター中に挿入することで HIV-1 感染で Rev が産生された時にのみ Gag が発現できるようにした。(B) の c, d (Rev 無し) と e, f (Rev 有り) で示されているように確かにそうになっている。a, b はそれぞれ陽性コントロールと陰性コントロールである。(C) の陽性コントロール (neo RF) と比較して明らかなように、変異 Gag 細胞 (C6b RF) は多量のウイルスを感染させてもその後ウイルスを産生しない。neo mock, 陰性コントロール。

展したが、困難な問題、すなわち最も重要な事柄が未解決である。それだけにやりがいもあり、これからも多くの若い医学研究者達の参加に期待したい。ヒトと HIV の長い闘いは21世紀まで持ち越されるのは確実で、更なる基礎研究が必要とされるであろう。

## 謝 辞

本稿の執筆に当たり、ご協力頂いた吉田和子さんに深謝いたします。

## 文 献

1. Adachi, A., Gendelman, H.E., Koenig, S., Folks, T., et al.: Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and non-human cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.*, **59** : 284-291, 1986
2. Shibata, R., Miura, T., Hayami, M., Ogawa, K., et al.: Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) genome in relation to HIV-1 and simian immunodeficiency virus SIVagm. *J. Virol.*, **64** : 742-747, 1990
3. Adachi, A., Ono, N., Sakai, H., Shibata, R., et al.: Generation and characterization of the human immunodeficiency virus type 1 mutants. *Arch. Virol.*, **117** : 45-58, 1991
4. Inubushi, R., Tamaki, M., Shimano, R., Koyama, A.H., et al.: Functional roles of HIV accessory proteins for viral replication. *Int. J. Mol. Med.*, **2** : 429-433, 1998
5. 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
6. 足立昭夫, 犬伏理津子, 島野玲香: 変異体によるヒト免疫不全ウイルス1型の複製抑制. *四国医誌*, **54** : 282-287, 1998
7. Fukumori, T., Akari, H., Iida, S., Hata, S., et al.: The HIV-1 Vpr displays strong anti-apoptotic activity. *FEBS Lett.*, **432** : 17-20, 1998
8. 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
9. 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
10. 足立昭夫, 大島陽子, 吉田和子, 天野一志 他: ヒト免疫不全ウイルスGag蛋白質の機能. *Minophagen Medical Review*, **43** : 199-212, 1998
11. Shimano, R., Inubushi, R., Fukumori, T., Tamaki, M., et al.: Suppression of HIV-2 replication by HIV-1 gag mutants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **248** : 418-421, 1998
12. Inubushi, R., Shimano, R., Oshima, Y., Yoshida, K., et al.: Suppression of HIV replication by dominant negative mutants of HIV-1. *Int. J. Mol. Med.*, **2** : 325-330, 1998
13. Shimano, R., Inubushi, R., Oshima, Y., and Adachi, A.: Inhibition of HIV/SIV replication by dominant negative gag mutants. *Virus Genes*, **18** : 197-201, 1999
14. Shibata, R., Kawamura, M., Sakai, H., Hayami, M., et al.: Generation of a chimeric human and simian immunodeficiency virus infectious to monkey peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.*, **65** : 3514-3520, 1991
15. Sakuragi, S., Shibata, R., Mukai, R., Komatsu, T., et al.: Infection of macaque monkeys with a chimeric human and simian immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.*, **73** : 2983-2987, 1992

*Molecular genetics of human immunodeficiency viruses**Yoko Oshima, and Akio Adachi**Department of Virology, The University of Tokushima School of Medicine, Tokushima***SUMMARY**

Various mutants of human immunodeficiency virus types 1 and 2 (HIV-1 and HIV-2) have been generated to do systemic genetic studies on virus replication, virus pathogenesis, AIDS animal models, and finally on the anti-AIDS therapy. We are particularly interested in the functions of the Gag proteins, the major viral proteins, and the accessory proteins (Vif, Vpx, Vpr, Vpu, and Nef) which are unique to HIV/SIV (simian immunodeficiency virus). In this brief review, we summarize our HIV projects with special reference to the functions of Gag and accessory proteins.

Key words : HIV, Gag, Vif, Vpx, Vpr, Vpu, Nef