

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	ウイルス粒子へのCCR5の取り込みによるR5 HIV-1の感染性低下
Author(s)	門出 和精
Citation	
Issue date	2008-03-25
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11108
Right	

学位論文
Doctor's Thesis

ウイルス粒子への CCR5 の取り込みによる R5 HIV-1 の感染性低下
(Impairment of R5 HIV-1 infectivity due to virion incorporated CCR5)

門出 和精
Kazuaki Monde

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻感染防御学

指導教員

原田 信志 教授
熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻感染防御学

2008 年 3 月

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文題名 : ウイルス粒子への **CCR5** の取り込みによる **R5 HIV-1** の感染性低下
(**Impairment of R5 HIV-1 infectivity due to virion incorporated CCR5**)

著 者 名 : 門出 和精
(単名) Kazuaki Monde

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻感染防御学
原田 信志 教授

審査委員名 :	病態制御学分野担当教授	松下 修三
	ウイルス制御学分野担当教授	滝口 雅文
	予防開発学分野担当教授	岡田 誠治
	感染免疫内科学分野担当教授	満屋 裕明

2008 年 3 月

目次

要旨	4
Abstract	5
学位論文の骨格となる参考論文	6
謝辞	7
略語一覧	8

研究の背景と目的

I ウイルス粒子への CCR5 の取り込みによる gp120 V3 依存的な R5 HIV-1 の感染性低下	9
II CD4 ⁺ T 細胞株、非 CD4 ⁺ T 細胞株から産生されるウイルスや細胞指向性の 異なるウイルスへの CCR5 の取り込み	12

実験方法

(1) 細胞	14
(2) ウイルスと HIV-1 gp120 V3 ループライブラリー	
(3) p24 Gag の ELISA による定量	15
(4) フローサイトメトリー	
(5) real-time PCR	
(6) シュードタイプウイルスの感染	16
(7) ウイルス感染性の定量	
(8) ウェスタンブロット解析	17
(9) ウイルス沈降実験	

実験結果

I	ウイルス粒子への CCR5 の取り込みによる gp120 V3 依存的な R5 HIV-1 の感染性低下	
(1)	PM1/CCR5 細胞で複製が抑制されるウイルスの分離	18
(2)	PM1/CCR5 細胞内への HIV-1 _{V3L#08} の侵入効率	23
(3)	HIV-1 _{V3L#08} 感染 PM1/CCR5 細胞からのウイルス産生	24
(4)	PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1 _{V3L#08} の感染性	26
(5)	HIV-1 _{V3L#08} 粒子への CCR5 の取り込み	27
(6)	R5 ^L 表現型の V3 ループ責任変異	30
II	CD4 ⁺ T 細胞株、非 CD4 ⁺ T 細胞株から産生されるウイルスや細胞指向性の 異なるウイルスへの CCR5 の取り込み	
(1)	Env 欠損ウイルスによる CCR5 の取り込み	34
(2)	細胞指向性が異なるウイルスへの CCR5 の取り込み	35
(3)	CD4 ⁺ T 細胞株と非 CD4 ⁺ T 細胞株から産生されるウイルスへの CCR5 の取り込み	36
(4)	CCR5 の取り込みによる感染性への影響	39

考察

I	ウイルス粒子への CCR5 の取り込みによる gp120 V3 依存的な R5 HIV-1 の感染性低下	41
II	CD4 ⁺ T 細胞株、非 CD4 ⁺ T 細胞株から産生されるウイルスや細胞指向性の 異なるウイルスへの CCR5 の取り込み	44
	結語	46
	参考文献	47

要旨

R5 HIV-1 の標的細胞への侵入にはウイルス粒子表面のエンベロープタンパク質 Env の gp120 と標的細胞上のレセプターCD4、コレセプターCCR5 との相互作用が要求される。本研究では CCR5 と直接相互作用する gp120 の V3 loop に 0-10 個のアミノ酸置換の組み合わせを持つ HIV-1_{JR-FLan} ライブラリーを使い、V3 領域の配列が異なる 45 種類の R5 HIV-1 クローンを分離し、CCR5 低発現 CD4⁺T 細胞 PM1 と高発現細胞 PM1/CCR5 でその複製能を比較した。その結果、6.7% (3/45) のウイルスは CCR5 低発現細胞では、野生株 HIV-1_{JR-FLan} と同様に効率よく複製するが、CCR5 高発現細胞では 1/10 以下にその複製が抑制されることがわかった。CCR5 高発現によるウイルス複製の抑制が何故おきるかを調べるために、そのうちのウイルスクローン HIV-1_{V3L#08} で検討を行った結果、野生株に比べてウイルスの侵入効率と産生量には影響していないことがわかった。しかし、CCR5 高発現細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} は、感染性が 1/20 に低下していた。またこのウイルスの膜エンベロープ上には CCR5 が効率よく取り込まれていることが、抗 CCR5 抗体 (T21/8) を使った免疫沈降で示された。以上から、PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} に効率よく CCR5 の取り込みが起きることによって、感染性の低下を引き起こしていることがわかった。また野生株である HIV-1_{JR-FLan} では、この取り込みは Env に関係なく起こるが、R5 HIV-1 エンベロープによりその取り込みは促進された。また CCR5 の HIV-1_{JR-FLan} への取り込みは、弱いながらもウイルスの感染性を抑制することが明らかとなった。これらの結果から、CD4⁺T 細胞では R5 HIV-1 感染後の CCR5 の挙動がウイルスの複製能に影響していることが明らかとなった。

Abstract

Entry of R5 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) into target cells requires sequential interactions of the envelope glycoprotein gp120 with the receptor CD4 and the coreceptor CCR5. I investigated replication of 45 R5 viral clones derived from the HIV-1_{JR-FLan} library carrying 0–10 random amino acid substitutions in the gp120 V3 loop, and found that 6.7% (3/45) of the viruses revealed ≥ 10 -fold replication suppression in PM1/CCR5 cells expressing high levels of CCR5 compared to PM1 cells expressing low levels of CCR5. In HIV-1_{V3L#08}, suppression of replication was not associated with entry events and viral production but to a marked decrease in infectivity of nascent progeny virus. HIV-1_{V3L#08}, generated from infected PM1/CCR5 cells, was 98% immunoprecipitated by anti-CCR5 monoclonal antibody T21/8, whereas the other infectious viruses were partially precipitated, suggesting that incorporation of larger amounts of CCR5 into the virions caused impairment of viral infectivity in HIV-1_{V3L#08}. Incorporation of CCR5 onto HIV-1_{JR-FLan} from CD4⁺T cells was decreased without Env. The amount of CCR5 incorporated onto R5 viruses was higher than that of X4 viruses. Furthermore, viral infectivity was weakly decreased by incorporated CCR5 onto HIV-1_{JR-FLan}. These results demonstrate the implications of an alternative influence of CCR5 on R5 HIV-1 replication in CD4⁺T cells.

学位論文の骨格となる参考論文

1. **Kazuaki Monde**, Yosuke Maeda, Yuetsu Tanaka, Shinji Harada, and Keisuke Yusa. Gp120 V3-dependent impairment of R5 HIV-1 infectivity due to virion incorporated CCR5. *J. Biol. Chem. in press*.
2. Keisuke Yusa, Yosuke Maeda, Aki Fujioka, **Kazuaki Monde**, and Shinji Harada. Isolation of TAK-779-resistant HIV-1 from an R5 HIV-1 GP120 V3 loop Library. *J. Biol. Chem.* **280** : 30083-30090. 2005.

謝辞

本研究は、熊本大学医学教育部感染防御学講座の原田信志教授、前田洋助准教授、遊佐敬介講師のあたたかいご指導のもとで行われたものです。

また、琉球大学大学院医学研究科免疫学分野の田中勇悦教授に YT-brand HIV-1 p24 ELISA Kit と抗 CCR5 抗体 (T312、T227) を分与して頂きました。

real-time PCR を行うにあたり、熊本大学エイズ学研究センター病態制御学分野の吉村和久助教と技術補佐員の本田晃子さんに助言して頂きました。

皆様方のご指導とご協力なくしてはこの仕事は完成しなかったと思われ、厚く御礼申し上げます。

略語一覽

BSA	bovine serum albumin
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
DRM	detergent-resistant membrane
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmic reticulum
FACS	fluorescence-activated cell sorter
FCS	fetal calf serum
HIV-1	human immunodeficiency virus type 1
LTR	long terminal repeat
mAb	monoclonal antibody
MAGI	multinuclear activation of a galactosidase indicator assay
MVB	multivesicular bodies
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
VLP	virus-like particle
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
°C	degree Celsius

研究の背景と目的

I ウイルス粒子への CCR5 の取り込みによる gp120 V3 依存的な R5 HIV-1 の感染性低下

標的細胞への R5 HIV-1 の侵入にはエンベロープタンパク質 Env の gp120 とレセプター-CD4、コレセプター-CCR5 の相互作用が必要である (X4 HIV-1 の場合はコレセプターとして CXCR4 を要求する) (Berger *et al.*, 1998; Doms *et al.*, 1997; Moore *et al.*, 1997)。これらの相互作用は細胞表面上のレセプターとコレセプター分子の数やその局在に依存している (Lin *et al.*, 2002; Peters *et al.*, 2004; Platt *et al.*, 1998; Reynes *et al.*, 2003)。Platt らは、CCR5 発現量と R5 HIV-1 の感染性について HeLa 細胞を用いて詳細な検討を行った (Platt *et al.*, 1998)。彼らによると CD4 の発現が高い細胞 (1×10^5 molecules/cell) では、CCR5 の数に依存することなく R5 HIV-1 の感染が起こる。しかし、CD4 の発現が低い細胞 (1×10^4 molecules/cell) では、CCR5 の細胞表面の分子数が 2×10^4 molecules/cell になるまで CCR5 の分子数に依存して感染効率が上がり、それ以上では依存せず飽和に達する (Platt *et al.*, 1998; Walter *et al.*, 2005)。ウイルス吸着侵入時 gp120 と CD4、CCR5 の結合は連続して起こる。最初に CD4 と gp120 が結合し、その結合により gp120 の構造が変化し、CCR5 結合部位が露出する (Kwong *et al.*, 1998; Trkola *et al.*, 1996; Wyatt *et al.*, 1998)。そのコレセプター結合部位はブリッジングシートと呼ばれる 4 本の β シート ($\beta 3$ 、 $\beta 2$ (内部ドメイン)、 $\beta 21$ 、 $\beta 20$ (外部ドメイン)) から構成される領域と V3 loop からなり、CCR5 の N 末との相互作用に重要な役割を担っている (Reeves *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2004; Rizzuto *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 2000; Suphaphiphat *et al.*, 2003; Chih-Chin Huang *et al.*, 2007)。最終的に、CCR5 と V3 loop (35-37 個のアミノ酸残基からなる) の直接的な相互作用によって融合ペプチド gp41 が構造変化を起こし、その結果、gp41 の融合ペプチドが細胞膜

に突き刺さり、2つの膜が近接するように折りたたまれることで、ウイルスと細胞の膜の融合が起こる (Rizzuto *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1996; Wyatt *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1999)。

HIV-1 感染後、感染細胞における CD4 と CCR5 の挙動には大きな違いがある。ウイルス感染後、CD4 の発現が down-modulation され、HIV の感染効率が減少する (Delwart *et al.*, 1989; Steck *et al.*, 1966)。これには HIV の Env とアクセサリタンパク質である Nef、Vpu が関係している。Nef は CD4 のインターナリゼーションやリソソームへの移送、および分解を促進する (Aiken *et al.*, 1994; Bresnahan *et al.*, 1998; Craig *et al.*, 1998; Greenberg *et al.*, 1998; Mangasarian *et al.*, 1997; Piguet *et al.*, 1998)。また Env、Vpu は新しく合成された CD4 が細胞表面に輸送されるのを妨げる働きをしている (Geleziunas *et al.*, 1994; Willey *et al.*, 1992)。CD4 が down-modulation されないと、新しく産生されたウイルスの gp120 と感染細胞膜表面に発現したままの CD4 が強く結合し、その結果、出芽直後のウイルスが細胞表面にトラップされ、蓄積する (Palese *et al.*, 1974)。また、CD4 との結合により出芽部位に gp120 が集積せず、新しく細胞から放出されるウイルスに gp120 が取り込まれない、もしくは機能を持たない gp120-CD4 複合体がウイルスに取り込まれ、その結果放出されたウイルスの感染性が著しく低下することが報告されている (Lama *et al.*, 1999; Levesque *et al.*, 2003)。

一方、HIV-1 感染後、CCR5 の down-modulation は、Nef により一部起こるという報告もあるが、CD4 でみられるような強い down-modulation は見られない (Michel *et al.*, 2005)。これは CD4 の結合によって gp120 の立体構造が変化し、CCR5 結合部位が露出されない限り、細胞表面に産生ウイルスをトラップすることはないからだと考えられる。これが、ウイルス侵入後、効率的なウイルス複製のために CCR5 を強く down-modulation する必要がある一つの理由と考えられる。それではウイルスの細胞への侵入後、CCR5 はウイルス複製に影響しないのであろうか。従来までの研究は、ウイルスの侵入過程におけるコレセプターとしての機能に限られ、ウイルス侵入後の CCR5

の影響については全く調べられてこなかった。本研究では、HIV-1 のライフサイクル全般を含んだ実験系によって HIV-1 の複製に及ぼす CCR5 の影響を検討した実験では、CCR5 低発現 PM1 細胞と CCR5 高発現 PM1/CCR5 細胞を用い、R5 HIV-1 がこの両者の細胞でどのように複製するかを比較検討した。用いたウイルスは、吸着侵入時 CCR5 と直接相互作用する gp120 V3 loop の構造が異なる 45 種類のクローンウイルスである。これらのウイルスは、HIV-1 V3 loop ライブラリーから分離した。このライブラリーは、臨床から得られた 31 株の V3 loop に含まれるアミノ酸をランダムに含み、更にコレセプタースイッチに影響を与えるアミノ酸、V3 構造を維持するために保存されているアミノ酸、糖鎖が結合する領域のアミノ酸に変異が入らないように設計されている。その結果、いくつかのウイルスで CCR5 発現量の違いによってウイルスの複製能が異なることがわかった。我々は、その中でも PM1 細胞では野生株 HIV-1_{JR-FLan} と同等に複製するが、PM1/CCR5 細胞では複製が極端に低下する HIV-1_{V3L#08} に注目して研究を進めた。このウイルスは CCR5 の高発現により V3 loop 依存的に複製能が強く低下したが、その原因は、産生されるウイルス粒子に CCR5 が取り込まれることにより感染性が低下するためであることがわかった。

II CD4⁺ T 細胞株、非 CD4⁺ T 細胞株から産生されるウイルスや細胞指向性の異なるウイルスへの CCR5 の取り込み

CD4⁺ T 細胞株では、CCR5 は DRM に局在することが報告されている (Popik *et al.*, 2002)。DRM とは、細胞膜もしくは MVB 上でコレステロールやスフィンゴ脂質、特定の膜タンパク質などが集積している領域で、生化学的には界面活性剤に不溶な膜画分のことである (Brown and London, 1998; Brown and London, 2000; Skwarek, 2004)。ウイルスアッセムブリーとそれに続く出芽は、この DRM 直下にアンカーされた前駆体 Gag タンパク質と DRM 上に発現した Env (gp41、gp120) が集積した細胞膜や MVB で起きると考えられている (Holm *et al.*, 2003; Lindwasser and Resh, 2001; Nguyen and Hildreth, 2000; Ono and Freed, 2001; Rousso *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2003)。従って感染後、CCR5 の局在に変化がなければ、DRM 上にある CCR5 は受動的にウイルスエンベロープに取り込まれる結果になると予想された。ところが、HLA-DR (Cantin *et al.*, 1997; Cantin *et al.*, 1997)、CD63 (Meerloo *et al.*, 1992; Meerloo *et al.*, 1993; Orentas *et al.*, 1993) などの他の感染細胞由来のタンパク質がウイルス粒子に取り込まれることが次々と報告されてきたが、CCR5 のウイルス粒子への取り込みは、確認されなかった (Lallos *et al.*, 1999)。しかし、前回の研究で初めて、gp120 V3 loop 変異ウイルス HIV-1_{V3L#08} ばかりでなく、その野生株である HIV-1_{JR-FLan} にも CCR5 が取り込まれることが明らかになった。

ウイルスの出芽が細胞膜もしくは MVB のいずれで起こるかは、細胞によって異なる (Nydeffer *et al.*, 2003; Sherer *et al.*, 2003; von Schwedler *et al.*, 2003)。マクロファージでは、前駆体 Gag タンパク質は、細胞膜にアンカーされた後、再び MVB へと輸送され、MVB 内にアッセムブリー出芽される (Harila *et al.*, 2006; Jouvenet *et al.*, 2006; Neil *et al.*, 2006; Rudner *et al.*, 2005)。従って細胞によってはアッセムブリーの場所や

出芽する位置、CCR5 の局在の違いによって、産生されるウイルス粒子に取り込まれないケースも考えられる。また、その取り込みがどんな仕組みで起こっているのかについては不明なままである。そこで本研究では、CCR5 の HIV-1_{JR-FLan} への取り込みが、何故どのようにして起きるのかについて、PM1 以外の CD4⁺ T 細胞株、非 CD4⁺ T 細胞株から産生されるウイルスや細胞指向性の異なるウイルスを用いて検討した。

実験方法

(1) 細胞

ヒト CD4⁺T 細胞株 PM1 (Lusso *et al.*, 1995) は NIH AIDS Research and Preference Regent Program より分与を受け、最終 10% 非動化 FCS (Vitromex)、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた RPMI1640 (Invitrogen) で継代した。PM1/CCR5 細胞は pG1TKneo-CCR5 (Maeda *et al.*, 2000) と pVSV-G をトランスフェクションした PA317 clone#8 細胞と共培養し、PM1 細胞にレトロウイルスを介して CCR5 の発現遺伝子を導入した。MAGIC5 (Hachiya *et al.*, 2001) と 293T 細胞は 10% 非動化 FCS、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (ICN Biomedicals) で継代した。

(2) ウイルスと HIV-1 gp120 V3 loop ライブラリー

pJR-FLan は我々の研究室で pJR-FL (京都大学、小柳義夫先生より分与を受けた) から作られた。Env の V3 loop をはさんで AflIII と NheI の制限酵素切断部位を導入してある。本実験で用いた R5 ウイルスは、HIV-1 V3 loop ライブラリーから分離した。このライブラリーは pJR-FLan の gp120 V3 loop にランダムなアミノ酸置換を 0-10 個含んでおり、その変異の組み合わせは 27,648 通りである (Yusa *et al.*, 2005)。V3 loop のアミノ酸置換は Los Alamos HIV Sequence Database (<http://www.hiv.lanl.gov/>) より得た R5 HIV-1 31 株の V3 領域に出現したアミノ酸置換を参考にして次の 3 つの点に留意して設計されている。①V3 loop の N 末のアミノ酸配列 CTRPNNNTR、V3 loop の頭頂部にあたる GPGRA、C 末の IRQAHC には変異を導入しない。②①の条件以外の位置で、変異の頻度が低い (≤ 1/31) 場合、アミノ酸残基を変更しない。③塩基に変異があっても、アミノ酸置換が伴わない場合は変異を挿入しない。こうした条件により、V3 loop を形成する 35 アミノ酸残基中 10 箇所の位置を選び 0-10 個の変異をそれ

どれランダムな組み合わせで挿入した。ウイルスの調製は 293T 細胞 (1×10^6) にリン酸カルシウム共沈法 (Promega) を用いて 8 μ g のウイルス DNA を導入した。28 時間後、上清を回収し、0.22 μ m フィルター (Millipore) でろ過後、-80°C に保存した。

(3) p24 Gag の ELISA による定量

PM1、PM1/CCR5 細胞 (4×10^4) に 8 ng の p24 Gag 量のウイルスを 2 時間感染させた。感染細胞を PBS で 2 回洗浄し、37°C、5% CO₂ で培養した。感染 6 日後、上清中の p24 Gag の量を p24 Gag ELISA (Zeptometrix) を使って測定した。

(4) フローサイトメトリー

細胞表面に発現する CD4 と CCR5 をフローサイトメトリー (BD) で解析した。細胞を反応液 (3% FCS, PBS) に懸濁し、抗 CD4 抗体 (SK3, BD Biosciences Pharmingen) もしくは抗 CCR5 抗体 (2D7, BD Biosciences Pharmingen) をそれぞれ加え、4°C で 30 分間反応させた。洗浄液 (0.5% Tween 20, PBS) で 2 回洗浄後、FITC 結合した 2 次抗体 (抗マウス IgG) を 4°C で 30 分間反応させた。再び 2 回洗浄し、FACSscan で調べた。結果は BD Cell Quest ver. 3.1 ソフトウェアで解析した。

(5) real-time PCR

ウイルス (8 ng、p24 Gag) を含んだ培養液に、690 U DNase I (Worthington Biochem) を加え、室温で 1 時間静置する。そのウイルスを PM1、PM1/CCR5 細胞に感染させ、37°C で 2 時間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗い、37°C で 8 時間培養した。QIAamp DNA blood kit (Qiagen) を使い、DNA を精製し、全量 200 μ l で抽出した。そのうち 2 μ l を real-time PCR による解析に用い、685-789 を増幅するプライマー (forward primer: 5'-ACATCAAGCAGCCATGCAAAT-3', reverse primer: 5'-ATCTGGCCTGGTGCAATAGG-3', probe:

5'-FAM-CATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGA-TAMRA-3') を使い、後期逆転写産物を検出した。プライマーをそれぞれ 0.9 pmol、プローブを 0.25 pmol 使い、TaqMan Universal PCR master mix に加え、PCR を 3 回行った。反応は 95°C、10 分を 1 cycle、その後 95°C、15 秒、60°C、1 分を 40 cycles 繰り返し行った。反応には ABI Prism model 7700 thermal cycler (Applied Biosystems) を使用した。

(6) シュードタイプウイルスの感染

ルシフェーゼレポーター遺伝子を組み込んだ HIV-1 シュードタイプウイルスは、pNL-LucR-E⁻ (Mariani *et al.*, 2000) と Env 発現プラスミド pCXN-EnvJR-FLan、pCXN-EnvJR-FLan-A69T、pCXN-EnvV3L#08、pCXN-EnvV3L#08-A69T を 293T 細胞にトランスフェクションすることによって調製した。シュードタイプウイルスを含む上清の p24 Gag 濃度を 8 ng/ml に調製し、前日に播種した 48 穴プレート中の PM1、PM1/CCR5 細胞 (1×10^4) に 1 ml 加えた。2 時間後、細胞を PBS で 2 回洗い、48 時間後、ホタルルシフェーゼ活性を luciferase assay system (Promega) を用いて、ルミノメーター (Berthold) で測定した。

(7) ウイルス感染性の定量

ウイルス感染性を調べるため、感染前日に 5×10^3 個の MAGIC5 細胞 (Hachiya *et al.*, 2001) を 48 穴プレートに播き培養した。翌日、段階希釈したウイルスを加え、37°C で 2 時間培養した。その後、細胞を PBS で洗い、更に 37°C で培養した。感染 48 時間後、細胞を固定液 (1% ホルムアミド, 0.2% グルタルアルデヒド) で 5 分処理後、2 回 PBS で洗い染色液 (1 mM MgSO₄, 3 mM potassium ferricyanide, 3 mM potassium ferrocyanide, 0.4 mg/ml X-gal) で 1 時間細胞を染め、青く染まったフォーカスの数を計測した (Kimpton and Emerman, 1992)。

(8) ウェスタンブロット解析

感染 4 日後 HIV-1 感染細胞の上清中のウイルスを $175,000 \times g$ で 60 分間遠心して沈澱させる。ウイルスタンパク質 (10 ng, p24 Gag) を 5-20% SDS ポリアクリルアミドゲルで分離し、重ねた PVDF メンブレン (Millipore) にタンパク質を転写し (200 V, 2 時間)、そのメンブレンをブロッキング液 (5% スキムミルク, 137 mM NaCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 1 時間震とうした。1 次抗体として抗 gp120 抗体 (Aalto Bio Reagents) と抗 gp41 抗体 (2F5, NIH AIDS Research and Preference Regent Program) を用い、horseradish peroxidase 標識した 2 次抗体 Anti-Sheep (IgG, SIGMA)、Anti-Human (IgG, ZYMED) を用い、ケミルミワン (Nacalai Tesque) で検出した。

(9) ウイルス沈降実験

ウイルス濃縮後、3% BSA を含んだ PBS に溶かし、p24 Gag を 10 ng/ml に調製する。100 μl のウイルス液に 1 μg の抗体を加え、4°C で一晩静置する。10 μl の Pansorbin (Calbiochem) を 3% BSA を含んだ PBS で 3 回洗った後、抗体と共に一晩インキュベートしたウイルス液に加え、37°C で 30 分静置する。その後、 $350 \times g$ で 30 分間遠心し、ウイルス-抗体-Pansorbin 複合体を取り除き、上清中の p24 Gag を定量した (Esser *et al.*, 2001)。抗体は抗 CCR5 抗体 (T21/8, BioLegend; 2D7, BD Biosciences Pharmingen; 3A9, BD Biosciences Pharmingen)、抗 HLA-DR 抗体 (L243, BD Biosciences Pharmingen)、抗 CXCR4 抗体 (12G5, BD Biosciences Pharmingen)、抗 HCV 抗体 (Mo-8) (Inudoh *et al.*, 1998) を用いた。

実験結果

I ウイルス粒子への CCR5 の取り込みによる gp120 V3 依存的な R5 HIV-1 の感染性低下

(1) PM1/CCR5 細胞で複製が抑制されるウイルスの分離

R5 HIV-1 V3 loop ライブラリーは V3 loop に含まれる 0-10 個のアミノ酸置換をランダムな組み合わせで含むように設計されている (Figure 1)。このライブラリーから 45

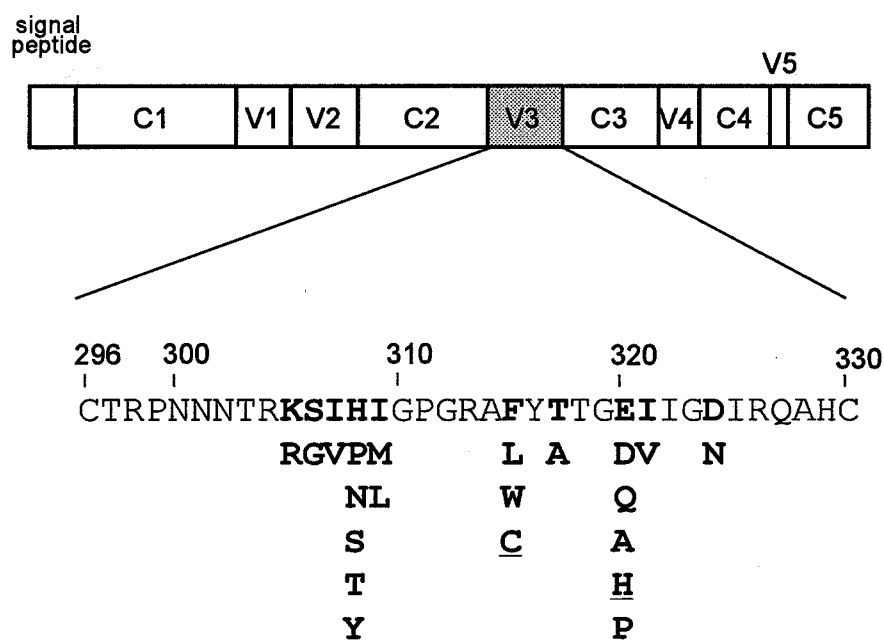


Figure 1. R5 HIV-1 V3 loopライブラリーに含まれるアミノ酸置換

それぞれのウイルスクローンはgp120のV3 loopに0-10個のアミノ酸置換を含むように設計されている。ウイルスライブラリーのバックグラウンドとしてpJR-FLanを用いた。アミノ酸置換の組み合わせの数は27,648通りである。太字はランダムに取り込まれる変異を示す。下線のアミノ酸は31株のR5ウイルスに検出されなかった変異であるが、ヌクレオチド変異の組み合わせによって不可避免に入る。

種類のウイルスを分離し、PM1 と PM1/CCR5 細胞に感染させてそれぞれの複製能を感染 6 日後に比較した (Table 1)。PM1/CCR5 細胞は CCR5 発現レンチウイルスベクタ

Table 1 HIV-1 V3 loopライブラリーから分離したウイルスの複製

Viral clone	V3 sequence	p24 Gag antigen (ng/ml) ^a		
		PM1	PM1/CCR5	ratio ^b
HIV-1 _{JR-FLan}	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTTGEIIGDIRQAHC	140	270	1.9
#01RG.PM.....HV.....	18	50	2.8
#02L.....L.A..D..N.....	17	54	3.2
#03RG.PL.....C.A..AV.....	<1.0	<1.0	-
#04RGVYL.....PV.....	<1.0	<1.0	-
#05R..NL.....L.....V..N.....	70	49	0.7
#06R.VS.....L.A..V..N.....	46	17	0.4
#07RG.PM.....W.A..H.....	23	20	0.9
#08VTM.....L.A..DV..N.....	83	8.0	0.1
#09GVNL.....L.A..DV.....	51	20	0.4
#10S.....A..HV..N.....	21	220	10
#11RGV.L.....PV.....	<1.0	<1.0	-
#12VN.....A..PI..N.....	<1.0	<1.0	-
#13R.VNL.....W....Q.....	4.0	5.0	1.3
#14RGVPL.....A.....	<1.0	<1.0	-
#15G..L.....C....H..N.....	<1.0	<1.0	-
#16RG.YM.....L....QV.....	6.0	160	27
#17RGVPL.....A..DV..N.....	3.0	10	3.3
#18YL.....L....P..N.....	<1.0	<1.0	-
#19GVT.....W.A.....	38	29	0.8
#20RGVYM.....C....A..N.....	<1.0	<1.0	-
#21NL.....Q....N.....	7.0	140	20
#22VPM.....A.VAV..N.....	5.0	53	11
#23VNM.....L....D.....	120	14	0.1
#24R.VPL.....W.A.....N.....	3.0	3.0	1.0
#25R.V.M.....V..N.....	70	6.0	0.1
#26GVTL.....L....V.....	<1.0	<1.0	-
#27GVNL.....L....V.....	13	8.0	0.6
#28G.PL.....L.A..HV..N.....	40	47	1.2
#29RG.PM.....PV..N.....	7.0	100	14
#30SM.....W.A..P..N.....	2.0	2.0	1.0
#31L.....C....H..N.....	<1.0	<1.0	-
#32RG..L.....L.....N.....	3.0	3.0	1.0
#33T.....W....PV..N.....	3.0	5.0	1.7
#34GVYM.....L.S..D.....	7.0	170	24
#35RGV.L.....W.A..H..N.....	2.0	2.0	1.0
#36RG.....H.....	3.0	3.0	1.0
#37TM.....L.A..P..N.....	<1.0	<1.0	-
#38G.Y.....D.....	3.0	23	7.7
#39Y.....P.....	5.0	37	7.4
#40RG.TL.....W.A.....	<1.0	<1.0	-
#41G..M.....C....PV..N.....	<1.0	<1.0	-
#42RG.....L.A..PV..N.....	<1.0	<1.0	-
#43L.....L.A..PV.....	60	24	0.4
#44VP.....C.A..A..N.....	<1.0	<1.0	-
#45RGET.....L....AV..N.....	<1.0	<1.0	-

^a PM1、PM1/CCR5細胞 (4 × 10⁴) に、それぞれウイルス (8 ng p24 Gag) を感染させた。感染6日後、ウイルス複製能はp24 Gag ELISAによって定量した。結果は、3回実験を行い、得られた結果の平均値を示す。

^b ratio、PM1/CCR5細胞の上清中のp24 Gagの濃度を、PM1細胞の上清中のp24 Gagの濃度で割った値を示す。

一を導入し、PM1 細胞に CCR5 を過剰発現させた細胞で、CD4 の発現量は PM1 細胞と比較してほぼ同程度である (Figure 2)。調べたウイルスの 36% (16/45) はどちら

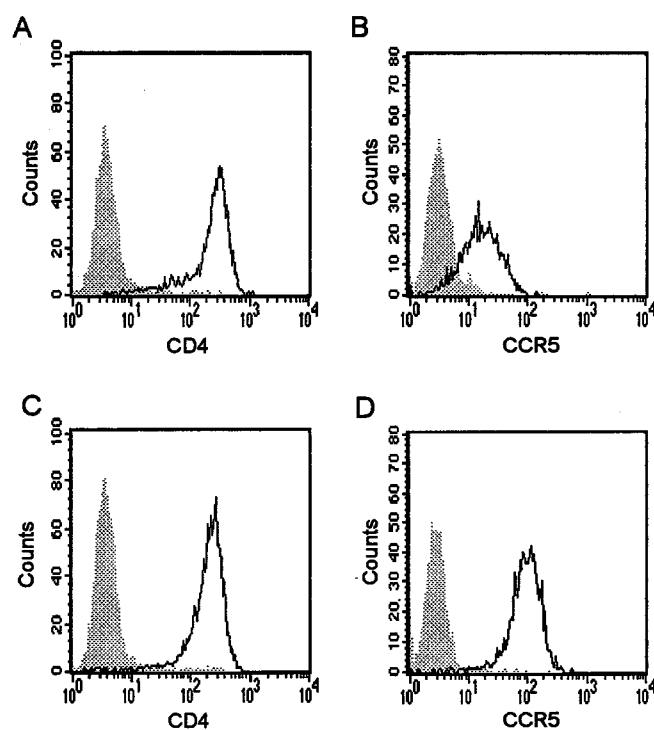


Figure 2. PM1、PM1/CCR5細胞におけるCD4、CCR5の発現

細胞はCD4、CCR5に対するモノクローナル抗体 (SK3もしくは2D7) で染め、フローサイトメトリーで解析を行った。(A) PM1細胞でのCD4の発現、(B) PM1細胞でのCCR5の発現、(C) PM1/CCR5細胞でのCD4の発現、(D) PM1/CCR5細胞でのCCR5の発現。黒塗りのヒストグラムは2次抗体だけで染めたバックグラウンドを示す。白抜きのヒストグラムはそれぞれの一次抗体で染めたものを示す。

の細胞でもほとんど複製しなかった (< 1.0 ng/ml p24 Gag)。PM1、PM1/CCR5 細胞でのウイルスの複製能を比較すると、p24 Gag の比は ≤ 0.1 から 27 までの範囲を示し

た。野生株の HIV-1_{JR-FLan} ではその比は 1.9 であった。これらの結果から、45 種類のウイルスは次の 3 つのグループに分類できることがわかった。① PM1 細胞より PM1/CCR5 細胞で効率 (ratio ≥ 10) よく複製できるウイルス、これを R5^H タイプのウイルスと呼ぶことにする。② PM1 と PM1/CCR5 細胞双方で複製能に大きな差 ($0.1 < \text{ratio} < 10$) がないウイルス、これを R5^{HL} と呼び、③ PM1/CCR5 細胞で複製能が低いウイルス、これを R5^L と呼ぶことにする。45 種類のウイルスのうち次の 6 種類 (13%)、HIV-1_{V3L#10}、HIV-1_{V3L#16}、HIV-1_{V3L#21}、HIV-1_{V3L#23}、HIV-1_{V3L#29}、HIV-1_{V3L#34} は R5^H に分類した。また HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#23}、HIV-1_{V3L#25} の 3 種類のウイルスは R5^L に分類できた。これらの結果は、CD4⁺ T 細胞株において R5 HIV-1 の複製能をみた場合、CCR5 の発現量に影響を受けるウイルスがあることを示している。またこのように CCR5 発現量によって複製能が異なるウイルスは V3 loop にのみ変異を持つことから、その表現型は V3 loop の構造に依存していることがわかった。

本研究では、R5^L タイプのウイルスである HIV-1_{V3L#08} に焦点をあて、なぜ CCR5 高発現することでウイルス複製が抑制されるのかについて更に以下の解析を行った。HIV-1_{V3L#08} の複製能は PM1/CCR5 細胞では著しく減少するのに対して、PM1 細胞では野生株 HIV-1_{JR-FLan} と同等の複製能を示した (Figure 3A, B)。感染 6 日後では上清中の p24 Gag は PM1 細胞に比べて PM1/CCR5 細胞では 1/10 に低下していた。しかしながら HIV-1_{V3L#08} のような複製能の低さは 3 人の健常人から分離した末梢リンパ球ないしマクロファージでは観察されなかった (data not shown)。HIV-1_{V3L#08} は gp120 の V3 領域に 8 箇所のアミノ酸置換を含んでいる。その変異は I307V、H308T、I309M、F315L、T317A、E320D、I321V、D324N である。

HIV-1_{V3L#08} のリバータントウイルスである HIV-1_{V3L#08-A69T} は、gp120 の C1 領域の Ala⁶⁹ が Thr に変化していることがわかった。この変異によってウイルスは PM1/CCR5 細胞での複製能が野生株並に回復した (Figure 3B, C)。HIV-1_{JR-FLan-A69T} と HIV-1_{V3L#08-A69T} は PM1 細胞で HIV-1_{JR-FLan} と同等の複製能を示した。しかしながら、PM1/CCR5 細胞では

HIV-1_{JR-FLan-A69T} と HIV-1_{V3L#08-A69T} は 4、5 日後でみると HIV-1_{JR-FLan} より高い複製能を示した。

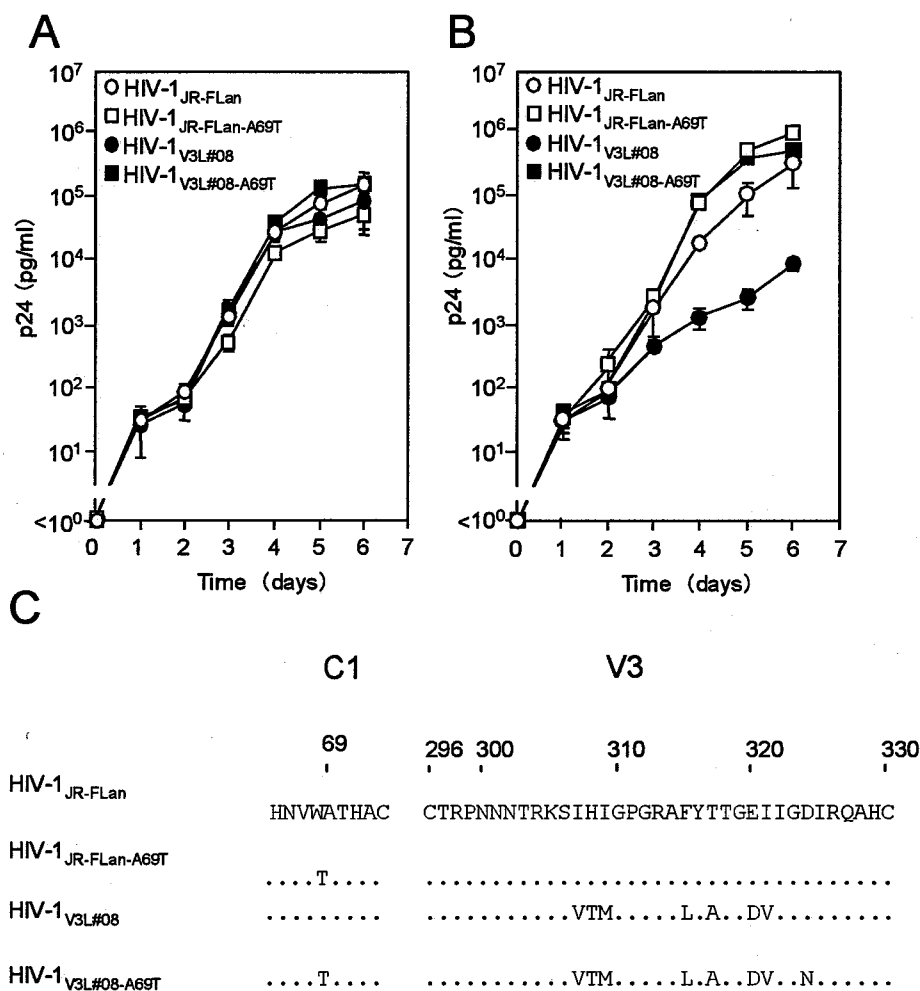


Figure 3. PM1/CCR5細胞でのHIV-1_{V3L#08}の複製抑制

(A) PM1細胞でのHIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T}、HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#08-A69T}の複製。
 (B) PM1/CCR5細胞でのそれぞれの複製。細胞は8 ngのp24 Gagを感染させた。ウイルス複製は細胞上清のp24 Gag産生量を経時的に調べた。これらの実験は3回繰り返した。エラーバーは3回の実験で得られた値の標準偏差を示す。
 (C) HIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T}、HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#08-A69T}のgp120のV3 loopやC1領域のアミノ酸置換。

HIV-1_{V3L#08} の PM1/CCR5 細胞における複製能の低下は、細胞から産生されるケモカインに対するウイルスの感受性が高くなっていることが原因である可能性が考えられた。PM1/CCR5 細胞から産生されるケモカインのために、HIV-1_{V3L#08} の複製が特異的に抑制されているかもしれない。この可能性を検討するため、HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#08-A69T}、HIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T} の β ケモカイン (RANTES) に対する感受性を調べたが、期待されたような有意な差はみられなかった (data not shown)。したがってケモカインの関与は否定された。

(2) PM1/CCR5 細胞内への HIV-1_{V3L#08} の侵入効率

HIV-1_{V3L#08} の侵入効率が低下しているかどうか検討するために、real-time PCR によって、感染 8 時間後に逆転写後期産物である gag DNA の細胞内蓄積量を調べた (Figure 4A)。PM1 細胞に比べ、PM1/CCR5 細胞での HIV-1_{V3L#08} の gag DNA 合成能は減少しておらず、むしろ、PM1/CCR5 細胞での HIV-1_{V3L#08} の DNA コピー数は PM1 細胞より 3.3 倍高かった。他のウイルスにおいても同様に PM1/CCR5 細胞で侵入効率が高く (1.9-2.5 倍)、さらに PM1/CCR5 細胞において 4 種類のウイルスで DNA 合成量にはっきりとした違いは見られなかった

また、HIV-1_{V3L#08} の Env で包まれたシュードタイプウイルスを作製し、single round での感染性を調べた。real-time PCR の結果と同様に PM1 細胞よりも PM1/CCR5 細胞で 2.0 倍以上のルシフェラーゼ活性を示した (Figure 4B)。PM1/CCR5 細胞での他のウイルスのルシフェラーゼ活性を調べたが、PM1 細胞に比べ 1.7-2.2 倍増加していた。このことは、PM1/CCR5 細胞での HIV-1_{V3L#08} の複製抑制はウイルスライフサイクルの初期段階に関係していないことが明らかとなった。

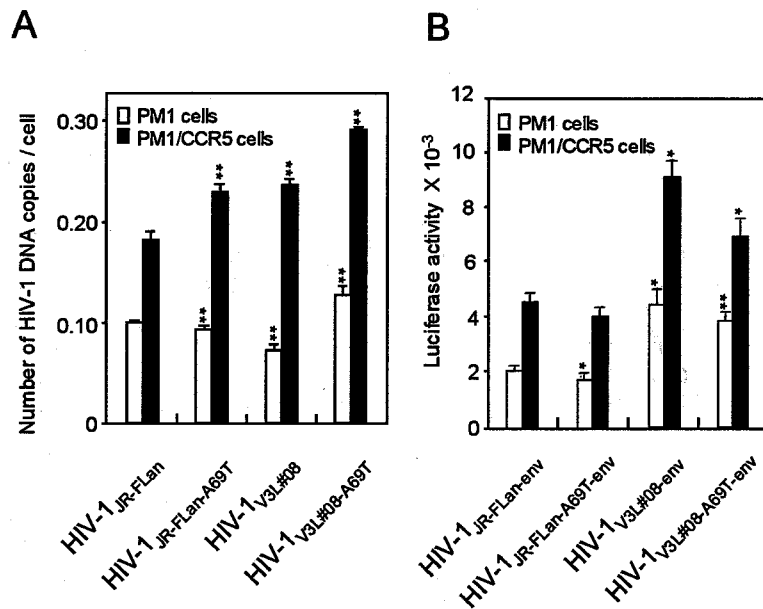


Figure 4. PM1、PM1/CCR5細胞内へのHIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T}、HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#08-A69T}の侵入効率

(A) PM1、PM1/CCR5細胞にそれぞれのウイルス (30 ng p24 Gag) を2時間感染させた。感染8時間後、合成されたHIV-1 DNA分子数をTaqMan real-time PCRで定量した。(B) PM1、PM1/CCR5細胞に、HIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T}、HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#08}のエンベロープを持つシュードタイプウイルス (8 ng p24 Gag) を2時間感染させた。感染48時間後、細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を調べた。これらの実験は3回繰り返し行った。エラーバーは3回の実験で得られた値の標準偏差を示す。*, P<0.01; **, P<0.001。統計的有意差はそれぞれHIV-1_{JR-FLan}とのt-testによって計算した。

(3) HIV-1_{V3L#08} 感染 PM1/CCR5 細胞からのウイルス産生

感染した PM1 と PM1/CCR5 細胞から産生されるウイルスの量を比較した。感染後、24 時間後に逆転写酵素阻害剤 (AZT) と CCR5 阻害剤 (TAK779) を加え、産生されたウイルスの二次感染を阻害した。ここで用いた AZT と TAK779 の濃度はそれぞれ 4 μ M (IC₅₀ より 78 倍高い) と 1 μ M (IC₅₀ より 32 倍高い) である。感染 2 日後、上清中に産生されたウイルスを p24 Gag ELISA によって定量したところ、HIV-1_{V3L#08} 感染

PM1/CCR5 細胞から産生されたウイルス量は HIV-1_{V3L#08} 感染 PM1 細胞と比較して 5.7 倍高かった (Figure 5)。HIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T}、HIV-1_{V3L#08-A69T} においても同様の結果が得られた。感染 PM1/CCR5 細胞から産生されたそれぞれのウイルス量は感染 PM1 細胞よりも 3.8-8.7 倍高かった。PM1/CCR5 細胞からのウイルス産生量の増加は、Figure 4 で示した侵入効率の高さと同様の傾向を示した。このことから、HIV-1_{V3L#08} の PM1/CCR5 細胞での複製能の低下は、ウイルスの産生量の低下が原因ではないことがわかった。

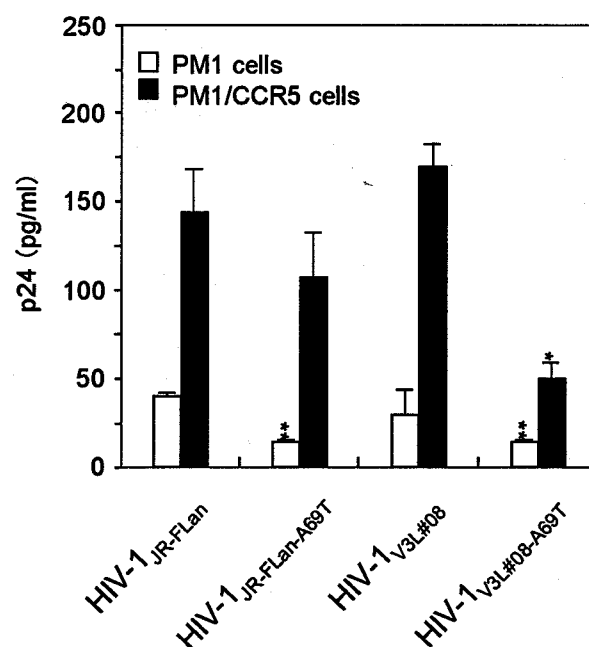


Figure 5. AZT、TAK779存在下でのPM1、PM1/CCR5細胞からのHIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T}、HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#08-A69T}の産生

それぞれのウイルス (8ng p24 Gag) を2時間、細胞に感染させた後、1 μ M AZTと4 μ M TAK779を加えた。2日後、上清中のp24 Gagのレベルをp24 Gag ELISAによって定量した。これらの解析は3回繰り返し行った。エラーバーは3回の実験で得られた値の標準偏差を示す。*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$ 。統計的有意差はそれぞれHIV-1_{JR-FLan}とのt-testによって計算した。

(4) PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} の感染性

次に、293T、PM1、PM1/CCR5 細胞から産生されたウイルスの感染性を MAGIC5 細胞にて比較検討した (Figure 6)。MAGIC5 細胞は HIV LTR に β -ガラクトシダーゼ遺伝子を連結した発現系を HeLa 細胞に導入した細胞である。HIV-1 の感染が起きると、Tat によって β -ガラクトシダーゼの転写が起きるので、感染細胞を X-gal によって染色することによって、ウイルスの感染性を決定できる (Hachiya *et al.*, 2001)。その結果

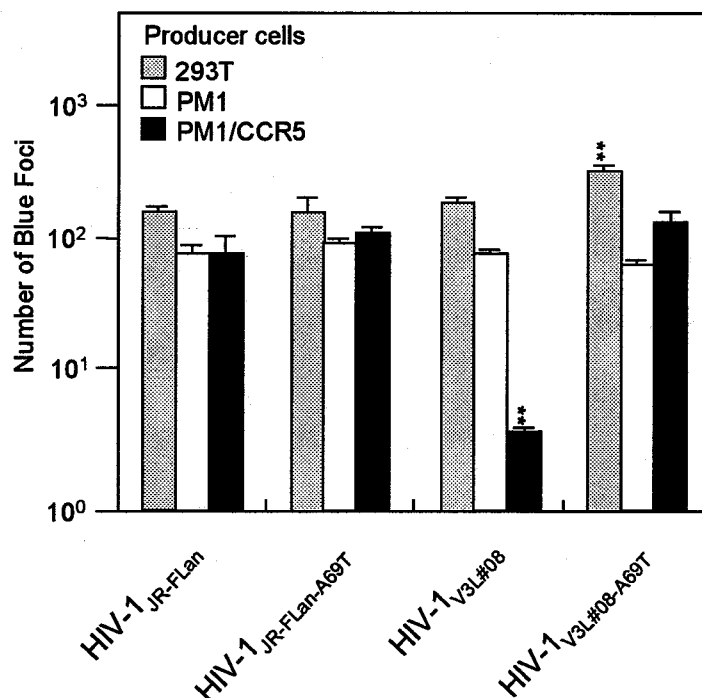


Figure 6. 293T、PM1、PM1/CCR5細胞から産生された HIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T}、HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#08-A69T} のウイルス感染性

ウイルスの感染性はMAGIC5細胞 (CD4とCCR5を発現しており、更にHIV-1 LTRによって制御される β -ガラクトシダーゼ発現カセットを含むHeLa細胞) に感染させることで決定した。MAGIC5細胞にそれぞれのウイルスを2時間感染させた。感染48時間後、細胞を固定し、X-galで染めた。青く染まったフォーカスの数を3点で計測した。これらの実験は3回繰り返し行った。エラーバーは3回の実験で得られた値の標準偏差を示す。

**, $P < 0.001$ 。統計的有意差はそれぞれHIV-1_{JR-FLan}とのt-testによって計算した。

MAGIC5 細胞は、293T、PM1 細胞から産生されたそれぞれのウイルスに同程度感染した。ところが、PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} の感染性は HIV-1_{JR-FLan} と比較すると 1/20 に減少していた。これに対してリバータントである HIV-1_{JR-FLan-A69T} は PM1/CCR5 細胞から産生されたものは、感染性が減少することはなかった。以上の結果から、PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} の感染性の低下が PM1/CCR5 細胞における HIV-1_{V3L#08} の複製能の低下の原因になっていることがわかった。

(5) HIV-1_{V3L#08} 粒子への CCR5 の取り込み

HIV-1_{V3L#08} の感染性の低下に CCR5 の分子数が及ぼす影響について 2 つの可能性が考えられる。第 1 の可能性は CCR5 の高発現によって何らかの理由で、例えば感染細胞膜表面ないしゴルジ体、ER など Env と相互作用し、Env が出芽領域に集積できず、その結果、ウイルス粒子に Env が取り込まれない可能性である。第 2 の可能性は高発現した CCR5 が、例えば Env と相互作用することで、ウイルス粒子に取り込まれ、CCR5 によって Env の機能が低下し、感染性が低下する可能性である。そこで 1 つ目の可能性を検討するために、各ウイルス粒子の Env (gp120, gp41) をウエスタンブロットによって比較した (Figure 7)。その結果、PM1 細胞に比べて PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} では gp120、gp41 のウイルス粒子への取り込みに有意な差はなかった。このことから高発現 CCR5 は gp120 と gp41 の取り込みに影響しないことがわかった。また 293T、PM1、PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{JR-FLan-A69T} と HIV-1_{V3L#08-A69T} では HIV-1_{JR-FLan} や HIV-1_{V3L#08} と比較するとわずかに gp120 と gp41 の量が高かった。A69T 変異は、PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} の感染性欠損をウイルスへの gp120 と gp41 の取り込みを増加することで補っているのかもしれない。

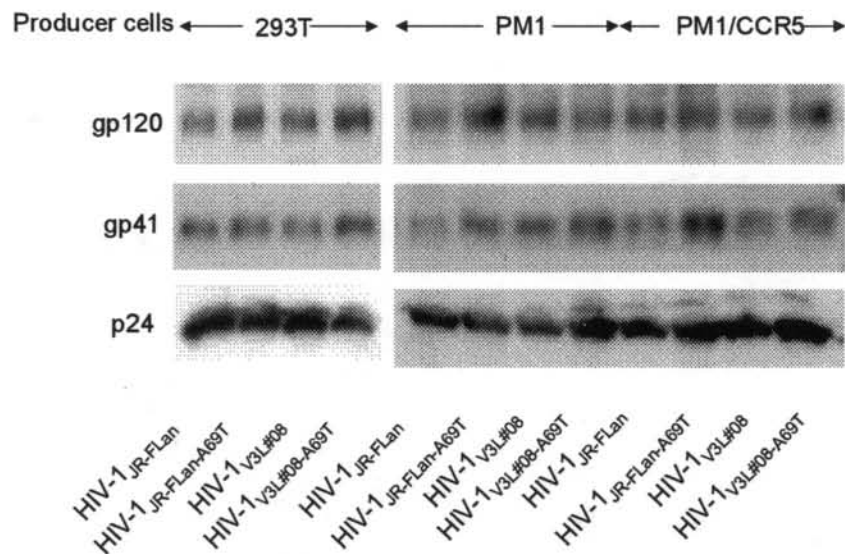


Figure 7. ウイルス粒子へのgp120、gp41の取り込み

293T、PM1もしくはPM1/CCR5細胞から産生されたHIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T}、HIV-1_{v3L#08}、HIV-1_{v3L#08-A69T} (10 ng p24 Gag) を1 % SDSで溶解後、4-20 % SDS-PAGEを行い、転写後、gp120、gp41、p24に対するポリクローナル抗体を用い、ウェスタンブロットにより検出した。

次に CCR5 がウイルス粒子に取り込まれ、HIV-1_{v3L#08} の gp120 の機能を阻害している可能性を抗 CCR5 抗体を用いて、ウイルスを免疫沈降することによって検討した (Figure 8A, 8B)。HLA-DR は感染細胞膜からウイルスエンベロープに取り込まれることが知られている (Cantin *et al.*, 1997; Cantin *et al.*, 1997)。実際に抗 HLA-DR 抗体 (L243) を用いると、PM1 細胞、PM1/CCR5 細胞から産生されたウイルスはいずれも免疫沈降することが確認できた。一方、HCV の抗 E2 タンパク質抗体 (Mo-8) や抗 CD4

抗体 (SK3)、抗 CXCR4 抗体 (12G5、4G10) はウイルスを免疫沈降しなかった。同様に CCR5 の第 2 細胞外 loop を認識する抗 CCR5 抗体 (2D7) (Lee *et al.*, 1999) や CCR5 の N 末と第 1 細胞外 loop を認識する抗 CCR5 抗体 (3A9) (O'Conner *et al.*, 2005) も、ウイルスを免疫沈降することができなかった。ところが、CCR5 の N 末を認識す

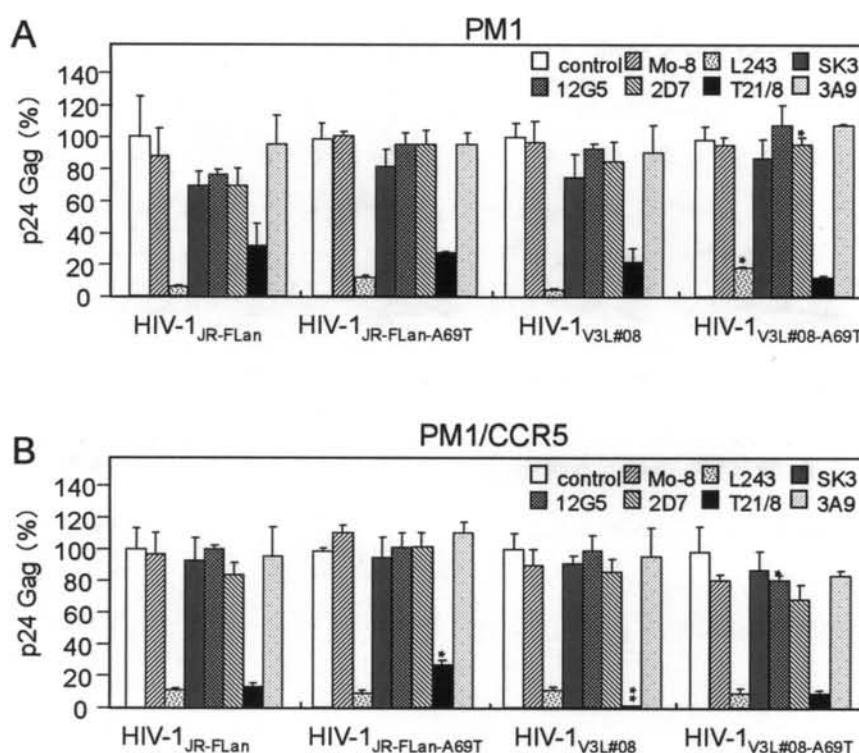


Figure 8. ウイルス粒子へのCCR5の取り込み

ウイルス免疫沈降法は抗HCV抗体 (MO-8)、抗HLA-DR抗体 (L243)、抗CD4抗体 (SK3)、抗CXCR4抗体 (12G5)、抗CCR5抗体 (2D7、T21/8、3A9) を用いて行った。PM1、PM1/CCR5細胞上清中のウイルス (5 ng) を、8時間、1 μ gのモノクローナル抗体とインキュベートした。ウイルス-抗体複合体はPansorbinを加えて沈降させた。ウイルス-抗体複合体を沈降させた後、上清中のp24 Gagを定量した。これらの実験は3回繰り返し行った。エラーバーは3回の実験で得られた値の標準偏差を示している。*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$ 。統計的有意差はそれぞれHIV-1_{JR-FLan}とのt-testによって計算した。

る抗 CCR5 抗体 (T21/8) は CCR5 発現のない 293T 細胞から産生されたウイルスを免疫沈降できなかったのに対し(data not shown)、PM1、PM1/CCR5 細胞から産生されたウイルスを免疫沈降することができた。特に PM1 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} や他のウイルスは T21/8 で部分的にしかウイルスを免疫沈降できなかったのに対し (69-88%) (Figure 8A)、PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} はほぼ完全にウイルスを免疫沈降できた (98%) (Figure 8B)。このことは CCR5 が HIV-1_{V3L#08} 粒子上に最も効率よく取り込まれていることを示している。以上から CCR5 の取り込み量が高いことが HIV-1_{V3L#08} の感染性を減少させていることが示唆された。さらにウイルス粒子に取り込まれる CCR5 を確認するために、抗 gp120 抗体 (2G12) を用いた免疫沈降法で CCR5 を含むエキソソームを除去し、その精製ウイルスをウエスタンブロットにより解析した。しかし、抗 CCR5 抗体の感度が低いためウイルスに取り込まれた CCR5 を検出することはできなかった (data not shown)。

(6) R5^L 表現型の V3 loop 責任変異

45 種類のウイルスクローンのうち 3 種類のウイルスが R5^L の表現型を示した (Table 1)。Ile³⁰⁷ から Val、Ile³⁰⁹ から Met へのアミノ酸置換はこの 3 種類のウイルスで共通して見られたことから、この 2 個のアミノ酸置換が R5^L 表現型に重要であることを示している。また R5^L 表現型である HIV-1_{V3L#08} の V3 loop に含まれる 8 個の変異をそれぞれ評価するため、それぞれのアミノ酸置換を単独で含む 8 種類のウイルスを調製し、それぞれの表現型を決定した (Table 2)。その結果、HIV-1_{I307V} や HIV-1_{I309M} は PM1/CCR5 細胞で複製が強く抑制され、R5^L ウイルスに重要であることが裏付けられた。(Table 1)。

Table 2 V3 loopにアミノ酸置換を1個含むHIV-1の複製

Viral clone	V3 loop sequence	p24 Gag (ng/ml) ^a		
		PM1	PM1/CCR5	ratio ^b
HIV-1 _{JR-Flan}	CTRPNNNTRKSIHIGPGRAFYTGTGEIIGDIRQAHC	140	270	1.9
HIV-1 _{V3#08}VTM.....L.A..DV..N.....	83	8.0	0.1
HIV-1 _{I307V}V.....	100	11	0.1
HIV-1 _{H308T}T.....	79	100	1.3
HIV-1 _{I309M}M.....	63	9.0	0.1
HIV-1 _{F315L}L.....	59	14	0.2
HIV-1 _{T317A}A.....	<1.0	<1.0	—
HIV-1 _{E320D}D.....	110	72	0.7
HIV-1 _{I321V}V.....	91	110	1.2
HIV-1 _{D324N}N.....	75	68	0.9

^a PM1、PM1/CCR5細胞（4 x 10⁴）に、それぞれウイルス（8 ng p24 Gag）を感染させた。感染6日後、ウイルス複製能はp24 Gag ELISAによって定量した。3回実験を行い、得られた結果の平均値を示す。

^b ratio、PM1/CCR5細胞の上清中のp24 Gagの濃度を、PM1細胞の上清中のp24 Gagの濃度で割った値を示す。

これらのアミノ酸置換の重要性を更に評価するために、HIV-1_{V3L#08} の8箇所のアミノ酸置換をランダムな組み合わせで持つウイルスを調製した（Table 3）。大部分のウイルスはPM1/CCR5細胞よりPM1細胞で高い複製能を示した（ratio ≤ 0.5）。12種類中4種類のウイルスはR5^L表現型で（ratio ≤ 0.1）、I307V ないしはI309M アミノ酸置換を含んでいた。I307V を含むウイルスは常に p24 Gag ratio が低い値を示した（ratio ≤ 0.3）のに対して、I309M を含むウイルスは必ずしも p24 Gag ratio が低いわけではなかった（Figure 9）。例えば、HIV-1_{V3L#130} は Ile³⁰⁹ を含んでいるが p24 Gag ratio は 1.4 であっ

た (Table 3)。更に、F315L を持つウイルスは他のアミノ酸置換との組み合わせによっ

Table 3 HIV-1_{V3L#08} V3 loopに含まれる8個のアミノ酸置換をランダムな組み合わせで持つHIV-1の複製

Viral clone	V3 loop sequence	p24 Gag (ng/ml) ^a		
		PM1	PM1/CCR5	ratio ^b
HIV-1 _{JR-Flan}	CTRPNNNTRKSIHIGPGRFYTTGEIIGDIRQAHG	140	270	1.9
HIV-1 _{V3L#08}VTM.....L.A..DV..N.....	83	8.0	<0.1
HIV-1 _{V3L#102}T.....L.....N.....	200	72	0.4
HIV-1 _{V3L#103}TM.....DV.....	150	<1.0	<0.1
HIV-1 _{V3L#104}VT.....A..DV..N.....	210	84	0.4
HIV-1 _{V3L#117}VT.....L.A..V.....	110	<1.0	<0.1
HIV-1 _{V3L#121}VT.....L.....V.....	120	<1.0	<0.1
HIV-1 _{V3L#124}TM.....A..DV.....	150	40	0.3
HIV-1 _{V3L#125}T.....A.....	14	170	11
HIV-1 _{V3L#127}VTM.....L.A.....N.....	200	<1.0	<0.1
HIV-1 _{V3L#128}VT.....L.A..D..N.....	160	30	<0.1
HIV-1 _{V3L#130}M.....A..D..N.....	130	180	1.4
HIV-1 _{V3L#132}TM.....V.....	160	70	0.4
HIV-1 _{V3L#133}VT.....A..V..N.....	120	20	0.2

^a PM1、PM1/CCR5細胞 (4 x 10⁴) に、それぞれウイルス (8 ng p24 Gag) を感染させた。感染6日後、ウイルス複製能はp24 Gag ELISAによって定量した。3回実験を行い、得られた結果の平均値を示す。

^b ratio、PM1/CCR5細胞の上清中のp24 Gagの濃度を、PM1細胞の上清中のp24 Gagの濃度で割った値を示している。

ては低い p24 Gag ratio になったが、F315L 単独では R5^L 表現型にならなかった。この結果は、1 個ないしは 2 個のアミノ酸置換だけでは R5^L 表現型にならず、鍵となるアミノ酸置換を含んだ複数のアミノ酸置換の組み合わせが重要であることを示している。以

上からその鍵となるアミノ酸残基は V3 loop のクラウン部分 (GPGR) に近接した Ile³⁰⁷、Ile³⁰⁹ であることがわかった。これらの V3 loop クラウンに近接したアミノ酸残基が CCR5 高発現細胞での複製抑制に重要である可能性が示された。

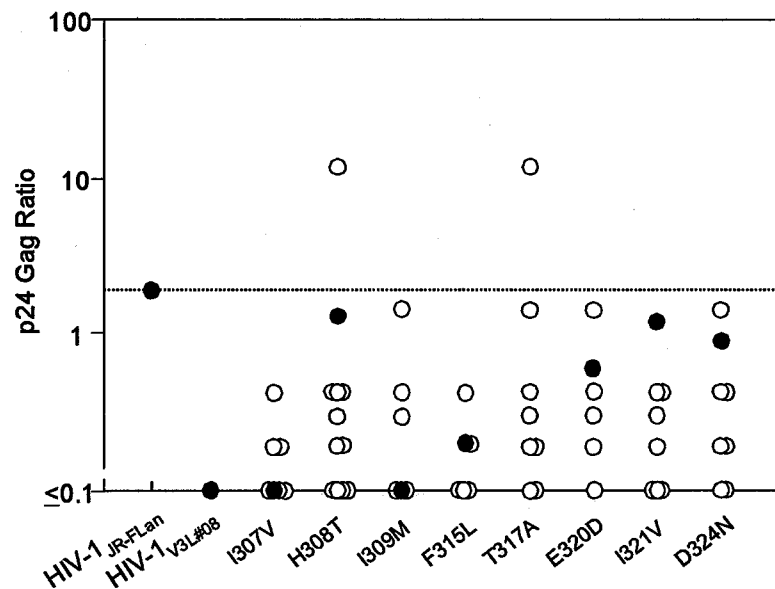


Figure 9. V3 loopに特定のアミノ酸置換を含んでいるウイルスのPM1、PM1/CCR5細胞での複製能のratio

Table 2の7個の変異ウイルスとTable 3の12個の変異ウイルスのp24 Gagのratioを示した。黒丸はV3 loopに1つのアミノ酸置換を含む変異ウイルス (Table 2) を示している。白丸はHIV-1_{V3L#08} V3 loopに含まれるアミノ酸置換をランダムな組み合わせで複数含むウイルス (Table 3) を示す。

II CD4⁺T 細胞株、非 CD4⁺T 細胞株から産生されるウイルスや細胞指向性の異なるウイルスへの CCR5 の取り込み

(1) Env 欠損ウイルスによる CCR5 の取り込み

CCR5 のウイルス粒子への取り込みに、Env (gp41, gp120) が影響しているかどうかを調べるために、Env 欠損ウイルス (HIV-1_{JR-FLanΔEnv}) を PM1、PM1/CCR5、293T 細胞に感染させて調製したウイルスを抗 CCR5 抗体で免疫沈降した (Figure 10)。PM1

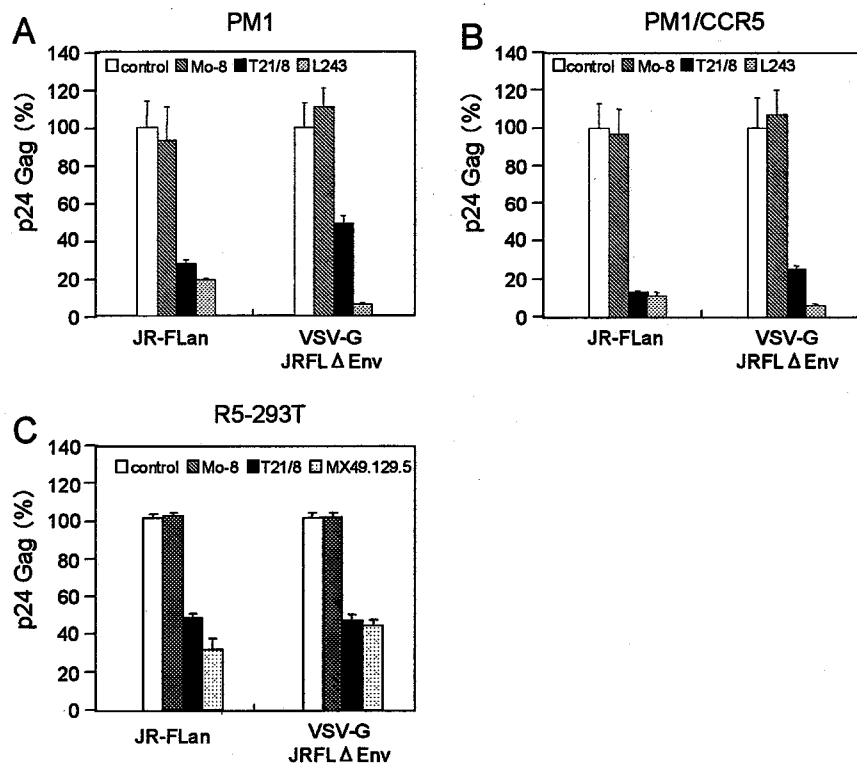


Figure 10. R5-293, PM1、PM1/CCR5細胞から産生されたエンベロープ欠損HIV-1_{JR-FLan}粒子へのCCR5の取り込み

ウイルス免疫沈降法は抗HCV抗体 (MO-8)、抗CCR5抗体 (T21/8)、抗HLA-DR抗体 (L243)、抗CD63抗体 (MX49.129.5) を用いて行った。エンベロープ欠損HIV-1_{JR-FLan}のVSV-Gシュドタイプウイルスをそれぞれの細胞に感染させた。感染2日目、それぞれの細胞上清中のウイルス (5 ng) を、8時間、1 μgのモノクローナル抗体とインキュベートした。ウイルス-抗体複合体はPansorbinを加えて沈降した後、上清中のp24 Gagを定量した。これらの実験は3回繰り返し行い、エラーバーは3回の実験で得られた値の標準偏差を示す。

細胞から産生された HIV-1_{JR-FLan} はその 70% を上清から抗 CCR5 抗体で沈降することができたが、Env 欠損によって、沈降するウイルス量は 50% に減少した (Figure 10A)。PM1/CCR5 細胞でも抗 CCR5 抗体は、HIV-1_{JR-FLan} の 90% のウイルスを沈降できたのに、Env 欠損によって 70% に減少した (Figure 10B)。以上から Env を欠損させることで免疫沈降の効率が低下することがわかった。このことから CCR5 のウイルス粒子への取り込みには、Env が必要ではないが、あることによって CCR5 のウイルスへの取り込みが増強することがわかった。R5-293T 細胞では、エンベロープが欠損したウイルスでも野生株と同量の CCR5 が取り込まれ、Env による取り込み増強効果はないことがわかった (Figure 10C)。以上から Env の CCR5 のウイルス粒子への取り込みへの影響は、細胞によって異なることがわかった。

(2) 細胞指向性が異なるウイルスへの CCR5 の取り込み

次に CXCR4 をコレセプターとして要求する X4 HIV-1、CCR5 と CXCR4 の両方を使うことが出来る R5/X4 HIV-1 への CCR5 の取り込みを PM1 細胞と PM1/CCR5 細胞産生ウイルスを調製して調べた (Figure 11)。R5 ウイルスとして HIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{BaL}、HIV-1_{YU-2}、R5/X4 ウイルスとして HIV-1_{89.6}、X4 ウイルスとして HIV-1_{NL4-3}、HIV-1_{IIIb} を比較した。PM1/CCR5 細胞から産生されたウイルスは、PM1 細胞から産生されたのに比べていずれのウイルスでも CCR5 の取り込み量が高い傾向を示した。また PM1 細胞から産生された R5 HIV-1 は 61-68% 免疫沈降したのに対し、X4 HIV-1 は 29-39% しか免疫沈降しなかった。同様に PM1/CCR5 細胞から産生された R5 HIV-1 は 80-87% 免疫沈降したのに対し、X4 HIV-1 は 46-52% しか免疫沈降しなかった。R5/X4 HIV-1 はその中間の結果を示した。この結果、R5 HIV-1 は R5/X4、X4 HIV-1 に比べて免疫沈降効率がよく、感染細胞からの CCR5 の取り込みは X4 HIV-1 に比べて R5 HIV-1 のほうが効率よいことがわかった。

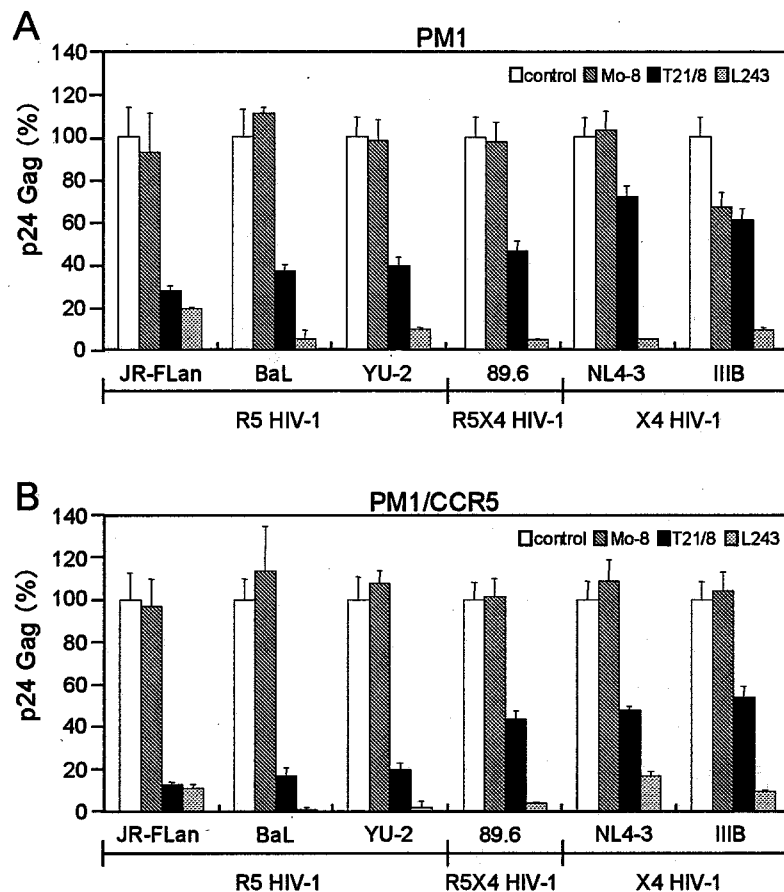


Figure 11. PM1、PM1/CCR5細胞から産生されたR5、R5X4、X4 HIV-1粒子へのCCR5の取り込み

ウイルス免疫沈降法は抗HCV抗体（MO-8）、抗HLA-DR抗体（L243）、抗CCR5抗体（T21/8）を用いて行った。PM1、PM1/CCR5細胞上清中のウイルス（5 ng）を、8時間、1 μ gのモノクローナル抗体とインキュベートした。ウイルス-抗体複合体はPansorbinを加えて沈降させ、上清中のp24 Gagを定量した。これらの実験は3回繰り返し行った。エラーバーは3回の実験で得られた値の標準偏差を示す。

(3) CD4⁺T 細胞株と非 CD4⁺T 細胞株から産生されるウイルスへの CCR5 の取り込み

次にウイルス産生細胞の違いによる CCR5 の取り込みを調べた (Figure 12)。CD4⁺T

細胞株である MT-4、Jurkat、MOLT-4、CEM 細胞に CCR5 を発現した細胞を樹立し、それぞれに HIV-1_{JR-FLan} を感染させて、ウイルスを調製した。MT-4、Jurkat 細胞は CCR5 をわずかに発現しており (Table 4)、R5 ウイルスである HIV-1_{JR-FLan} は感染することができるので、同様にウイルスを調製し、抗 CCR5 抗体によって免疫沈降し、強制発現

Table 4 CCR5、HLA-DR、CD63の発現量

	Control -	CCR5 2D7	CCR5 T21/8	HLA-DR L243	CD63 MX49.129.5
293T	3.47 ^a	3.64	3.92	3.50	11.95
R5-293T	3.66	453.33	475.42	ND	ND
COS-7	3.51	4.46	3.10	3.08	21.08
R5-COS-7	2.99	60.86	46.51	ND	ND
GHOST	3.10	4.00	2.97	2.92	8.95
R5-GHOST	12.04	131.89	115.69	ND	ND
HeLa	ND	ND	ND	ND	ND
R5-HeLa	2.67	63.07	45.43	ND	ND
MAGI	3.35	3.53	3.59	3.15	5.10
MAGI/CCR5	3.02	18.84	13.57	2.85	21.95
MAGIC5	2.85	32.50	28.06	12.20	7.21
NP2	ND	ND	ND	ND	ND
R5-NP2	4.89	647.48	534.68	ND	ND
MT-4	3.09	8.74	4.15	116.19	43.94
R5-MT-4	4.16	123.02	104.82	ND	ND
Jurkat	3.50	7.46	4.27	3.39	14.15
R5-Jurkat	2.96	418.38	393.66	ND	ND
MOLT-4/CCR5	2.82	7.30	4.05	2.80	4.62
R5-CEM	2.70	56.50	42.96	2.97	61.33
PM1	3.23	11.55	ND	83.68	15.54
PM1/CCR5	2.90	56.71	ND	137.50	16.87

^a CCR5発現レトロウイルスベクターによってCCR5を内発的に発現させた細胞をFACSscanで解析し、それぞれのMFIの値を示す。

細胞由来のウイルスと比較した。CCR5を発現させた MOLT-4/CCR5、R5-CEM 細胞は HIV-1_{JR-FLan} 感染可能になり、産生されたウイルスは、CCR5 が取り込まれることがわかる。CCR5 が少量だが発現している Jurkat と MT-4 細胞は、CCR5 過剰発現によって、R5-Jurkat 細胞由来のウイルスは CCR5 の取り込みがさらに増強するようになるが、MT-4 細胞では CCR5 の過剰発現に関わらず、ウイルスに CCR5 は取り込まれなかった。

非 CD4⁺T 細胞由来のウイルスについても調べた。293T 細胞でも、CCR5 発現により、産生されるウイルスに CCR5 が取り込まれるようになる (Figure 12)。しかし、Jurkat

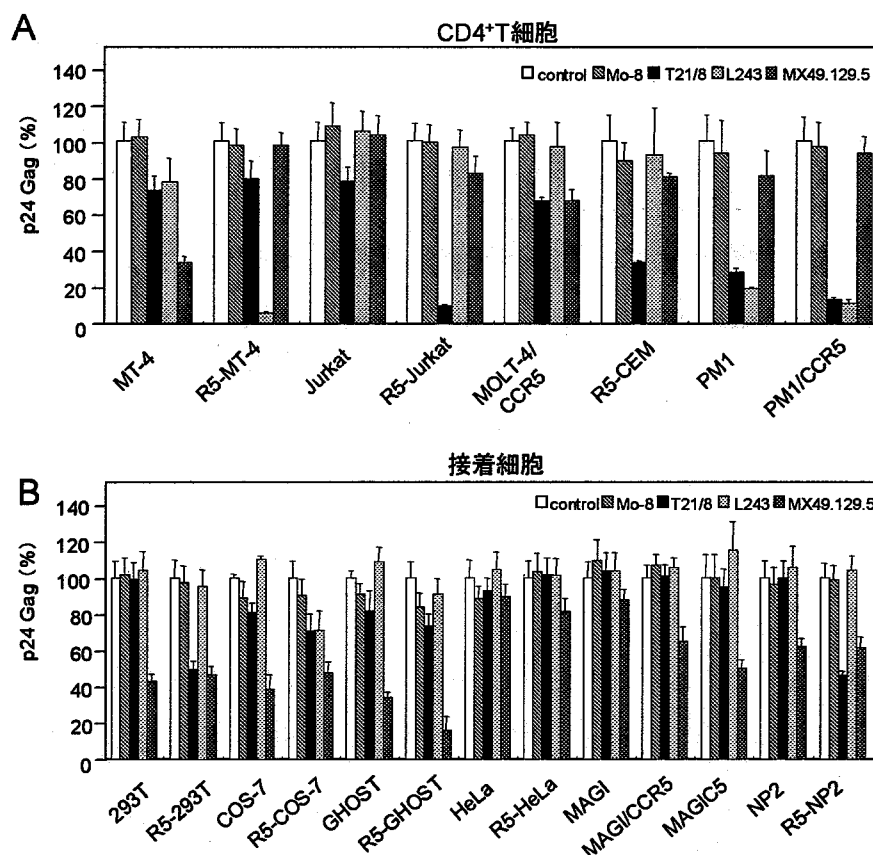


Figure 12. 接着細胞、CD4⁺T細胞から産生された HIV-1_{JR-FLan} 粒子への CCR5 の取り込み
ウイルス免疫沈降法は抗 HCV 抗体 (MO-8)、抗 HLA-DR 抗体 (L243)、抗 CD63 抗体 (MX49.129.5)、抗 CCR5 抗体 (T21/8) を用いて行った。細胞上清中のウイルスを、8 時間、1 μg のモノクローナル抗体とインキュベートした。ウイルス-抗体複合体は Pansorbin を加えて沈降させた。ウイルス-抗体複合体を沈降させた後、上清中の p24 Gag を定量した。これらの実験は 3 回繰り返し行った。エラーバーは 3 回の実験で得られた値の標準偏差を示す。

細胞と比較しても十分量の CCR5 を発現しているにもかかわらず、取り込みが悪かった。NP2 細胞も同様の結果が得られた。また、HeLa、GHOST、COS-7 細胞では CCR5 の過剰発現にもかかわらず、ウイルスに CCR5 は取り込まれなかった。これらの細胞では、CCR5 がウイルスのアッセンブリー、出芽が起きると考えられている DRM に局在しないのか、それとも DRM に局在する CCR5 のアッセンブリー、出芽を阻害する因子が存在する可能性がある。以上の結果は、ウイルスを産生する細胞によって、CCR5 が必ずしも取り込まれることはないということを示している。

(4) CCR5 の取り込みによる感染性への影響

前回の研究から、V3 loop に特定の変異をもつウイルスは CCR5 の取り込みによってその感染性が低下することがわかった。それでは野生株 HIV-1_{JR-FLan} では CCR5 の取り込みがウイルスの感染性に影響している可能性はないのだろうか。この点を明らかにするために、CCR5 をウイルスエンベロープに取り込んだウイルス粒子を除き、ウイルスの感染効率が上がるかどうかを検討した (Figure 13)。抗 CCR5 抗体による免疫沈降によって、CCR5 を取り込んだウイルス粒子を沈殿して除き、ウイルスを含む上清を p24 Gag を 1 ng/ml に合わせ、MAGIC5 細胞に感染させ、上清の感染性を調べた。その結果、T21/8 で免疫沈降したウイルスを除去し精製したウイルスは、精製しなかったウイルスに比べ、感染性が 1.4 倍あがることがわかった (Figure 13)。この結果は、野生株でも CCR5 の取り込まれたウイルスは弱いながらも感染性が低下していることを示している。

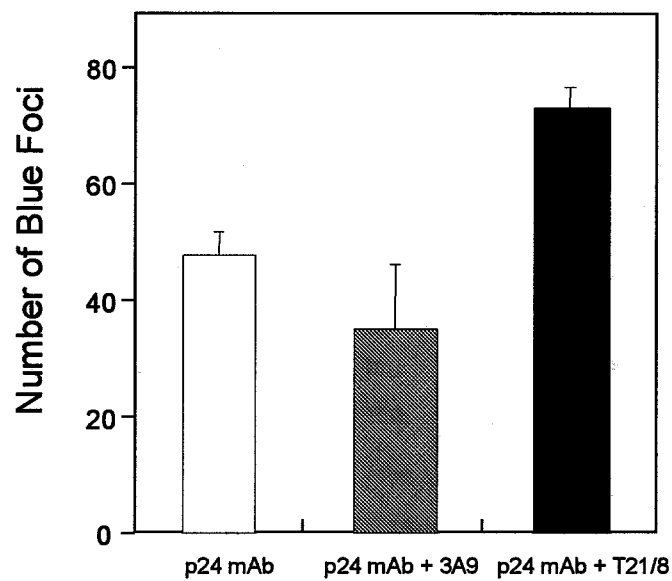


Figure 13. HIV-1_{JR-FLan}へのCCR5の取り込みによる感染性への影響

PM1細胞上清中のウイルス (0.5 μ g) を、8時間、50 μ gのモノクローナル抗体とインキュベートした。ウイルス-抗体複合体はPansorbinを加えて、その上清を回収し、上清中のウイルス (1 ng p24 Gag) をMAGIC5細胞に感染させた。感染48時間後、細胞を染色し、フォーカスの数を計測した。これらの実験は3回繰り返し行った。エラーバーは3回の実験で得られた値の標準偏差を示す。

考察

I ウイルス粒子への CCR5 の取り込みによる gp120 V3 依存的な R5 HIV-1 の感染性低下

本研究では R5 HIV-1 V3 loop ライブラリーから 45 種類のウイルスクローンを分離して、それぞれの複製能を CCR5 低発現、高発現細胞で比較検討した。その結果、このライブラリーに含まれるウイルスは、CCR5 の発現量によって異なる複製表現型を持つことがわかった。今回はそれらのウイルスの中で、PM1 細胞に比べると PM1/CCR5 細胞で複製が 1/33 に抑制された HIV-1_{V3L#08} (Figure 3B) に焦点をあてて解析を行った。PM1/CCR5 細胞におけるウイルス複製は感染初期過程に不具合はなかったが、産生されたウイルスの感染性が低下していることがわかった。MAGIC5 や NP2/CD4/hiCCR5 細胞では CD4 の発現量は PM1/CCR5 と同等だが、CCR5 発現量は PM1/CCR5 細胞とほぼ同じか、ないしはそれより高い。しかし、これらの細胞では、CCR5 の発現量のみが低い MAGI/CCR5、NP2/CD4/lowCCR5 細胞に比べ、PM1/CCR5 細胞でみられた HIV-1_{V3L#08} の CCR5 依存的な複製抑制は見られなかった (data not shown)。このことから、PM1 細胞株の膜表面に発現する CCR5 の分布が、これらの細胞とは異なっている可能性が示唆された。

HIV-1 は宿主細胞の表面に発現している細胞由来の分子をエンベロープに取り込む (Ott, 2002; Tremblay *et al.*, 1998)。取り込まれる分子として HLA-DR、ICAM-1 などの細胞表面タンパク質が知られている (Hoxie *et al.*, 1987; Ott, 1997)。一方、CD4 や CXCR4、CCR5 は取り込まれないと考えられてきた (Lallos *et al.*, 1999)。本研究で、抗 CCR5 抗体 (T21/8) を用いて、出芽したウイルスに CCR5 が取り込まれることを見出した。また、抗 CCR5 抗体である 2D7 や 3A9 は、PM1 や PM1/CCR5 細胞上の CCR5 は認識できるものの、細胞から産生されたウイルスエンベロープに取り込まれた CCR5

を認識し免疫沈降することはできなかった。この結果は 2D7 や 3A9 の認識エピトープがウイルスエンベロープ上で構造変化しているか、またはウイルス粒子上の他の分子と相互作用することによって、抗体のアクセスが阻害されていることを示している。2D7 のエピトープは Ala 変異スキャンによって Lys¹⁷¹ から Asp¹⁷² を含んだ第 2 細胞外 loop に位置していることがわかっている (Lee *et al.*, 1999)。3A9 のエピトープは、ファージディスプレイの結果から、N 末の Ser⁷、Ile⁹、Tyr¹⁰、Asp¹¹ と、第 1 細胞外 loop の His⁸⁸、Trp⁹⁴ に位置していると推定されている (O'Connor *et al.*, 2005)。一方、T21/8 は N 末の 22 個のアミノ酸残基からなる (Met¹ から Lys²²) ペプチドを用いて作られた抗体である。ウイルスが侵入する際、コレセプターと HIV-1 gp120 の結合は、V3 loop と gp120 のブリッジングシートに局在するコレセプター結合領域を介して起こる (Reeves *et al.*, 2002; Rizzuto *et al.*, 1998; Rizzuto *et al.*, 2000; Suphaphiphat *et al.*, 2003)。このとき CCR5 の N 末と第 1 細胞外 loop や第 2 細胞外 loop は gp120 と相互作用すると考えられている (Dragic *et al.*, 1998; Farzan *et al.*, 1998)。従ってウイルス上では CCR5 の第 1 細胞外 loop と第 2 細胞外 loop が構造変化ないし、抗体のアクセスが妨げられるような変化を起こしている可能性がある。それに対して N 末にある T21/8 のエピトープ周辺は T21/8 によって認識されやすいような状態であろうと推定される。

これまでのことから、PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} の感染性が低下する原因は次のように考えることができる。PM1 細胞、PM1/CCR5 細胞から産生された HIV-1_{JR-FLan}、HIV-1_{JR-FLan-A69T} の HIV-1_{V3L#08-A69T} は、細胞由来の CCR5 をウイルスエンベロープに取り込む。しかしながらウイルスの感染が阻害されなかったのは、取り込まれた CCR5 の量が少ないためであろうと考えられる (Figure 8)。同様に PM1 細胞から産生された HIV-1_{V3L#08} 内に取り込まれた CCR5 もウイルス感染性を阻害するのに十分な量ではないと考えられる。ところが PM1/CCR5 細胞からは、比較的多数の CCR5 分子がウイルス粒子内へと取り込まれ、その分子数はウイルス複製を抑制するのに十分なために、感染性を低下させていると考えられる。

もしそうでなければ、取り込まれた CCR5 は、HIV-1_{V3L#08} の V3 loop を介して同一膜上で gp120-CCR5 複合体を形成し、gp120 と gp41 の機能を特異的に阻害しているとも考えられる。また別の可能性として、ウイルス上の CCR5 は別のウイルスのエンベロープ上の HIV-1_{V3L#08} の gp120 と CD4 なしで相互作用している可能性もある。すなわち複数のウイルス粒子同士が gp120 と CCR5 を介して相互作用をすることで、凝集し、ウイルス感染性の低下を引き起こす可能性である。これらの点を明らかにするためには、PM1/CCR5 細胞での HIV-1_{V3L#08} gp120 と CCR5 分子の動きを更に詳しく検討する必要がある。

ドナーによって CCR5 発現量も様々であることが報告されている。健常人での CCR5 発現量を調べると末梢リンパ球に発現する CCR5 の量は個人によって約 20 倍程度異なっていることがわかっている (Moore, 2007)。CCR5 の発現量によって感染複製能が異なるとするなら、感染者の体内では、CCR5 の発現量の違いが HIV-1 エンベロープの進化の選択圧となっている可能性もある。しかし、PM1 から PM1/CCR5 まで発現レベルの範囲は *in vivo* での CCR5 発現細胞よりも高いため、今後は CCR5 の発現レベルを低い範囲に設定して研究する必要がある。

本研究によって、高レベルの CCR5 の発現は常に R5 HIV-1 の複製に必ずしも有利に働くわけではないことが明らかになった。HIV-1_{V3L#08}、HIV-1_{V3L#23}、HIV-1_{V3L#25} を含んだ R5⁺ 表現型と同じ V3 loop 配列は HIV-1 臨床分離株のデータベース (Los Alamos) では見つからなかった。これは、臨床では CCR5 の発現量に影響を受けない HIV-1 のみが優先的に広がっていることを示しているのかもしれない。

II CD4⁺T 細胞株、非 CD4⁺T 細胞株から産生されるウイルスや細胞指向性の異なるウイルスへの CCR5 の取り込み

前回の研究では、PM1、PM1/CCR5 細胞と V3 loop 変異ウイルスを中心に解析を行った。本研究では、前回の研究で野生株であるウイルスでも CCR5 の取り込みが見られたため、野生株の HIV-1_{JR-FLan} を用いて更に検討を加えた。まず CCR5 のウイルスへの取り込みに Env が必要かどうかを調べた。明らかになったことは、必ずしも Env が必要ではないということである。CD4⁺T 細胞株では CCR5 は DRM に局在するので (Popik *et al.*, 2002)、感染後ウイルスが DRM から出芽するとき出芽領域に局在している CCR5 がそのままウイルスエンベロープに取り込まれると考えると Env が必要とは考えられず、矛盾しない結果であった。しかし、293T 細胞では確認できなかったが、CD4⁺T 細胞株では Env があるとその取り込み量は高まることがわかった (Figure 10)。前回の研究結果から、ウイルス粒子に取り込まれた CCR5 は、非感染細胞膜上にあるときは 2D7 や 3A9 といった抗 CCR5 抗体で認識できたが、ウイルスに取り込まれると 2D7 や 3A9 によって認識できない状態になる。したがって、ウイルスへの取り込みが単なる受動的なプロセスなのかどうかについては本節の結果からだけでは明らかでなく、今後の解析が必要である。

CD4⁺T 細胞株では、MT-4 を除いていずれの細胞からの産生ウイルスも CCR5 の取り込みがみられた。一方 COS-7、GHOST、HeLa、細胞では CCR5 を発現しても CCR5 の取り込みがみられなかった。また 293T、NP2 細胞では CCR5 のウイルスへの取り込みがみられたが、発現量のわりには取り込み量が少なかった。(Figure 12)。この原因として、2つの可能性が考えられる。第1の可能性は、CCR5 の取り込みがみられなかった細胞では、細胞膜上のウイルスの出芽領域 DRM に CCR5 が局在しないことである。第2の可能性は、TZM、CHO 細胞では Nef が一部 CCR5 の down-modulation を引き起

こすという報告がある (Michel *et al.*, 2005)。Nef がどのようなメカニズムで CCR5 に影響を与えているかわかっていないが、CCR5 のウイルスのアッセンブリーもしくは出芽領域の CCR5 の局在を変えている可能性も考えられる。これらの点を明らかにするためには、今後 CCR5 の取り込みがみられなかった細胞で CCR5 が DRM に局在しているかどうかを調べ、また Nef 欠損ウイルスを感染させた場合、CCR5 の取り込みが回復するかどうか検討する必要がある。

ウイルスに取り込まれた CCR5 は V3 loop 変異ウイルスでは感染性低下を引き起こした。本節では、取り込まれた CCR5 が野生株である HIV-1_{JR-FLan} の感染性に影響を与えるのかどうかを調べた。その結果、CCR5 が取り込まれたウイルスを除去すると感染性が上がることがわかった。だが、この野生株は臨床分離株として分離されたウイルスであり、患者の体内で優位に複製していたウイルスであることから、その影響はウイルスの複製そのものに影響を与えるほど深刻な感染性低下ではない、もしくはそのような影響を与えるほどの CCR5 高発現細胞が存在しないことが考えられる。そのため、HIV-1 は進化の過程で複製のために敢えて、CCR5 に関しては、CD4 のように感染細胞における強い down modulation を起こす必要がなかったものと考えられる。

結語

CCR5 はウイルスにとって吸着侵入時にコレセプターとして働くばかりでなく、ウイルス粒子上に取り込まれることが明らかとなった。変異株 HIV-1_{V3L#08} では CCR5 は野生株に比べ多く取り込まれることで、感染性を低下させる。この取り込みは、Env に関係なく起こるが、PM1 細胞株では、R5 HIV-1 エンベロープによって、その取り込みは促進した。また、PM1 細胞株では、野生株ウイルスの感染性が取り込まれた CCR5 によって弱いながらも抑制されることが明らかとなった。

DRM に局在する細胞膜タンパク質は、エンベロープタンパク質がアッセンブリーする際に受動的にウイルス粒子に取り込まれる。その細胞膜タンパク質の中には、エンベロープタンパク質と相互作用するものがあり、これによりウイルスの感染性が変化する。ウイルス粒子上のこのような膜タンパク質には組成が変化するものがあり、今後はその原因を解明する必要がある。

参考文献

- Aiken, C. J. Konner, N. R. Landau, M. E. Lenburg, and D. Trono. 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76:853-64.
- Berger, E. A. R. W. Doms, E. M. Fenyo, B. T. Korber, D. R. Littman, J. P. Moore, Q. J. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. A. Weiss. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature* 391:240.
- Bresnahan, P. A. W. Yonemoto, S. Ferrell, D. Williams-Herman, R. Geleziunas, and W. C. Greene. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. *Curr. Biol.* 8:1235-8.
- Brown, D. A. and E. London. 1998. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 14:111-136.
- Brown, D. A. and E. London. 2000. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275:17221-17224.
- Cantin, R. J. F. Fortin, G. Lamontagne, and M. Tremblay. 1997. The acquisition of host-derived major histocompatibility complex class II glycoproteins by human immunodeficiency virus type 1 accelerates the process of virus entry and infection in human T-lymphoid cells. *Blood* 90:1091-100.
- Cantin, R. J. F. Fortin, G. Lamontagne, and M. Tremblay. 1997. The presence of host-derived HLA-DR1 on human immunodeficiency virus type 1 increases viral infectivity. *J. Virol.* 71:1922-30.
- Craig, H. M. M. W. Pandori, and J. C. Guatelli. 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95:11229-34.

- Delwart, E. L. and A. T. Panganiban. 1989. Role of reticuloendotheliosis virus envelope glycoprotein in superinfection interference. *J. Virol.* 63:273-80.
- Doms, R. W. and S. C. Peiper. 1997. Unwelcomed guests with master keys: how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 235:179-90.
- Dragic, T. A. Trkola, S. W. Lin, K. A. Nagashima, F. Kajumo, L. Zhao, W. C. Olson, L. Wu C. R. Mackay, G. P. Allaway, T. P. Sakmar, J. P. Moore, and P. J. Maddon. 1998. Amino-terminal substitutions in the CCR5 coreceptor impair gp120 binding and human immunodeficiency virus type 1 entry. *J. Virol.* 72:279-85.
- Esser, M. T. D. R. Graham, L. V. Coren, C. M. Trubey, J. W. Bess, Jr. L. O. Arthur, D. E. Ott, and J. D. Lifson. 2001. Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1) , CD86 (B7-2) , and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J. Virol.* 75:6173-82.
- Farzan, M. H. Choe, L. Vaca, K. Martin, Y. Sun, E. Desjardins, N. Ruffing, L. Wu, R. Wyatt, N. Gerard, C. Gerard, and J. Sodroski. 1998. A tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J. Virol.* 72:1160-4.
- Geleziunas, R. S. Bour, and M. A. Wainberg. 1994. Cell surface down-modulation of CD4 after infection by HIV-1. *Faseb. J.* 8:593-600.
- Greenberg, M. L. DeTulleo, I. Rapoport, J. Skowronski, and T. Kirchhausen. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. *Curr. Biol.* 8:1239-42.
- Hachiya, A. S. Aizawa-Matsuoka, M. Tanaka, Y. Takahashi, S. Ida, H. Gatanaga, Y. Hirabayashi, A. Kojima, M. Tatsumi, and S. Oka. 2001. Rapid and simple phenotypic assay for drug susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 using

- CCR5-expressing HeLa/CD4 (+) cell clone 1-10 (MAGIC-5) . *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:495-501.
- Harila, K. I. Prior, M. Sjöberg, A. Salmine, J. Hinkula, and M. Suomalainen. 2006. Vpu and Tsg101 regulate intracellular targeting of the human immunodeficiency virus type 1 core protein precursor Pr55gag. *J. Virol.* 80:3765-3772.
- Holm, K. K. Weclawicz, R. Hewson, and M. Suomalainen. 2003. Human immunodeficiency virus type 1 assembly and lipid rafts: Pr55 (gag) associates with membrane domains that are largely resistant to Brij98 but sensitive to Triton X-100. *J. Virol.* 77:4805-4817.
- Hoxie, J. A. T. P. Fitzharris, P. R. Youngbar, D. M. Matthews, J. L. Rackowski, and S. F. Radka. 1987. Nonrandom association of cellular antigens with HTLV-III virions. *Hum. Immunol.* 18:39-52.
- Huang, C. C. S. N. Lam, P. Acharya, M. Tang, S. H. Xiang, S. S. Hussan, R. L. Stanfield, J. Robinson, J. Sodroski, I. A. Wilson, R. Wyatt, C. A. Bewley, and P. D. Kwong. 2007. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science* 317:1930-4.
- Inudoh, M. N. Kato, and Y. Tanaka. 1998. New monoclonal antibodies against a recombinant second envelope protein of Hepatitis C virus. *Microbiol. Immunol.* 42:875-7.
- Joshi, A. K. Nagashima, and E. O. Freed. 2006. Mutation of dileucine-like motifs in the human immunodeficiency virus type 1 capsid disrupts virus assembly, gag-gag interactions, gag-membrane binding, and virion maturation. *J. Virol.* 80:7939-51.
- Jouvenet, N. S. J. Neil, C. Bess, M. C. Johnson, C. A. Virgen, S. M. Simon, and P. D. Bieniasz. 2006. Plasma membrane is the site of productive HIV-1 particle assembly. *PLoS Biol.* 4:e435.

- 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 beta-galactosidase gene. *J. Virol.* 66:2232-9.
- Kwong, P. D. R. Wyatt, J. Robinson, R. W. Sweet, J. Sodroski, and W. A. Hendrickson. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* 393:648-59.
- Lallos, L. B. S. Laal, J. A. Hoxie, S. Zolla-Pazner, and J. C. Bandres. 1999. Exclusion of HIV coreceptors CXCR4, CCR5, and CCR3 from the HIV envelope. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 15:895-7.
- Lama, J. A. Mangasarian, and D. Trono. 1999. Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner. *Curr. Biol.* 9:622-31.
- Lee, B. M. Sharron, C. Blanpain, B. J. Doranz, J. Vakili, P. Setoh, E. Berg, G. Liu, H. R. Guy, S. R. Durell, M. Parmentier, C. N. Chang, K. Price, M. Tsang, and R. W. Doms. 1999. Epitope mapping of CCR5 reveals multiple conformational states and distinct but overlapping structures involved in chemokine and coreceptor function. *J. Biol. Chem.* 274:9617-26.
- Levesque, K. Y. S. Zhao, and E. A. Cohen. 2003. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J. Biol. Chem.* 278:28346-53.
- Lin, Y. L. C. Mettling, P. Portales, J. Reynes, J. Clot, and P. Corbeau. 2002. Cell surface CCR5 density determines the postentry efficiency of R5 HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15590-5.
- Lindwasser, O. W. and M. D. Resh. 2001. Multimerization of human immunodeficiency virus type 1 Gag promotes its localization to barges, raft-like membrane microdomains.

- J. Virol. 75:7913-7924.
- Lusso, P. F. Cocchi, C. Balotta, P. D. Markham, A. Louie, P. Farci, R. Pal, R. C. Gallo, and M. S. Reitz, Jr. 1995. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1) : failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. J. Virol. 69:3712-20.
- Maeda, Y. M. Foda, S. Matsushita, and S. Harada. 2000. Involvement of both the V2 and V3 regions of the CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 envelope in reduced sensitivity to macrophage inflammatory protein 1alpha. J. Virol. 74:1787-93.
- Mangasarian, A. M. Foti, C. Aiken, D. Chin, J. L. Carpentier, and D. Trono. 1997. The HIV-1 Nef protein acts as a connector with sorting pathways in the Golgi and at the plasma membrane. Immunity 6:67-77.
- Mariani, R. G. Rutter, M. E. Harris, T. J. Hope, H. G. Krausslich, and N. R. Landau. 2000. A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. J. Virol. 74:3859-70.
- Meerloo, T. H. H. K. Parmentier, A. D. M. E. Osterhaus. 1992. Modulation of cell surface molecules during HIV-1 infection of H9 cells. An immunoelectron microscopic study. AIDS 6:1105-1116.
- Meerloo, T. M. A. Sheikh, and A. C. Bloem. 1993. Host cell membrane proteins on human immunodeficiency virus type 1 after in vitro infection of H9 cells and blood mononuclear cells. An immuno-electron microscopic study. J. Gen. Virol. 74:129-135.
- Michel, N. I. Allespach, S. Venzke, O. T. Fackler, and O. T. Keppler. 2005. The Nef protein of human immunodeficiency virus establishes superinfection immunity by a dual strategy to downregulate cell-surface CCR5 and CD4. Curr. Biol. 15:714-23.
- Moore, J. P. A. Trkola, and T. Dragic. 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. Curr. Opin.

- Immunol. 9:551-62.
- Moore, J. P. A. 1997. Coreceptors: Implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* 276:51-52.
- Neil, S. J. S. W. Eastman, N. Jouvenet, and P. D. Bieniasz. 2006. HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane. *PLoS Pathog.* 2:e39.
- Nguyen, D. and H. J. E. Hildreth. 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J. Virol.* 74:3264-72.
- Nydegger, S. M. Foti, A. Derdowski, P. Spearman, M. Thali. 2003. HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* 4:902-10.
- O'Connor, K. H. C. Konigs, M. J. Rowley, J. A. Irving, L. C. Wijeyewickrema, A. Pustowka, U. Dietrich, and I. R. Mackay. 2005. Requirement of multiple phage displayed peptide libraries for optimal mapping of a conformational antibody epitope on CCR5. *J. Immunol. Methods* 299:21-35.
- Ono, A. and E. O. Freed. 2001. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:13925-13930.
- Orentas, R. J. and J. E. K. Hildreth. 1993. Association of host cell surface adhesion receptors and other membrane proteins with HIV and SIV. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9:1157-1165.
- Ott, D. E. 1997. Cellular proteins in HIV virions. *Rev. Med. Virol.* 7:167-180.
- Ott, D. E. 2002. Potential roles of cellular proteins in HIV-1. *Rev. Med. Virol.* 12:359-74.
- Palese, P. K. Tobita, M. Ueda, and R. W. Compans. 1974. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology* 61:397-410.

- Peters, P. J. J. Bhattacharya, S. Hibbitts, M. T. Dittmar, G. Simmons, J. Bell, P. Simmonds, and P. R. Clapham. 2004. Biological analysis of human immunodeficiency virus type 1 R5 envelopes amplified from brain and lymph node tissues of AIDS patients with neuropathology reveals two distinct tropism phenotypes and identifies envelopes in the brain that confer an enhanced tropism and fusogenicity for macrophages. *J. Virol.* 78:6915-26.
- Piguet, V. Y. L. Chen, A. Mangasarian, M. Foti, J. L. Carpentier, and D. Trono. 1998. Mechanism of Nef-induced CD4 endocytosis: Nef connects CD4 with the mu chain of adaptor complexes. *Embo J.* 17:2472-81.
- Platt, E. J. K. Wehrly, S. E. Kuhmann, B. Chesebro, and D. Kabat. 1998. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72:2855-64.
- Popik, W. M. A. Timothy, and C. A. Wei. 2002. Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4+T cells. *J. Virol.* 76:4709-4722.
- Reeves, J. D. S. A. Gallo, N. Ahmad, J. L. Miamidian, P. E. Harvey, M. Sharron, S. Pohlmann, J. N. Sfakianos, C. A. Derdeyn, R. Blumenthal, E. Hunter, and R. W. Doms. 2002. Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:16249-54.
- Reeves, J. D. J. L. Miamidian, M. J. Biscone, F. H. Lee, N. Ahmad, T. C. Pierson, and R. W. Doms. 2004. Impact of mutations in the coreceptor binding site on human immunodeficiency virus type 1 fusion, infection, and entry inhibitor sensitivity. *J. Virol.* 78:5476-85.
- Reynes, J. V. Baillat, P. Portales, J. Clot, and P. Corbeau. 2003. Low CD4+ T-cell surface CCR5 density as a cause of resistance to in vivo HIV-1 infection. *J. Acquir.*

- Immune. Defic. Syndr. 34:114-6.
- Rizzuto, C. and J. Sodroski. 2000. Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16:741-9.
- Rizzuto, C. D. R. Wyatt, N. Hernandez-Ramos, Y. Sun, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, and J. Sodroski. 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* 280:1949-53.
- Rousso, I. M. B. Mixon, B. K. Chen, and P. S. Kim. 2000. Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13523-13525.
- Rudner, L. S. Nydegger, L. V. Coren, K. Nagashima, M. Thali, and D. E. Ott. 2005. Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 Gag in live cells by biarsenical labeling. *J. Virol.* 79:4055-4065.
- Sherer, N. M. M. J. Lehmann, L. F. Jimenez-Sato, A. Ingmundson, S. M. Horner, et al. 2003. Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 4:785-801.
- Skwarek, M. 2004. Recent controversy surrounding lipid rafts. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 52:427-431.
- Steck, F. T. and H. Rubin. 1966. The mechanism of interference between an avian leukemia virus and Rous sarcoma virus. I. Establishment of interference. *Virology* 29:628-41.
- Suphaphiphat, P. A. Thitithanyanont, S. Paca-Uccaralertkun, M. Essex, and T. H. Lee. 2003. Effect of amino acid substitution of the V3 and bridging sheet residues in human immunodeficiency virus type 1 subtype C gp120 on CCR5 utilization. *J. Virol.* 77:3832-7.

- Tremblay, M. J. J. F. Fortin, and R. Cantin. 1998. The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1. *Immunol. Today*. 19:346-51.
- Trkola, A. T. Dragic, J. Arthos, J. M. Binley, W. C. Olson, G. P. Allaway, C. Cheng-Mayer, J. Robinson, P. J. Maddon, and J. P. Moore. 1996. CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature* 384:184-7.
- Von Schwedler, U. K. M. Stuchell, B. Muller, D. M. Ward, H. Y. Chung, et al. 2003. The protein network of HIV budding. *Cell* 114:701-13.
- Walter, B. L. K. Wehrly, R. Swanstrom, E. Platt, D. Kabat, and B. Chesebro. 2005. Role of low CD4 levels in the influence of human immunodeficiency virus type 1 envelope V1 and V2 regions on entry and spread in macrophages. *J. Virol.* 79:4828-37.
- Wang, J. K. E. Kiyokawa, E. Verdin, and D. Trono. 2000. The Nef protein of HIV-1 associates with rafts and primes T cells for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:394-399.
- Willey, R. L. F. Maldarelli, M. A. Martin, and K. Strebel. 1992. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* 66:7193-200.
- Wu, L. N. P. Gerard, R. Wyatt, H. Choe, C. Parolin, N. Ruffing, A. Borsetti, A. A. Cardoso, E. Desjardin, W. Newman, C. Gerard, and J. Sodroski. 1996. CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384:179-83.
- Wyatt, R. P. D. Kwong, E. Desjardins, R. W. Sweet, J. Robinson, W. A. Hendrickson, and J. G. Sodroski. 1998. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393:705-11.
- Wyatt, R. and J. Sodroski. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* 280:1884-8.
- Yusa, K. Y. Maeda, A. Fujioka, K. Monde, and S. Harada. 2005. Isolation of

TAK-779-resistant HIV-1 from an R5 HIV-1 GP120 V3 loop library. *J. Biol. Chem.* 280:30083-90.

Zhang, W. G. Canziani, C. Plugariu, R. Wyatt, J. Sodroski, R. Sweet, P. Kwong, W. Hendrickson, and I. Chaiken. 1999. Conformational changes of gp120 in epitopes near the CCR5 binding site are induced by CD4 and a CD4 miniprotein mimetic. *Biochemistry* 38:9405-16.

Zheng, Y. H. A. Plemenitas, C. J. Fielding, and B. M. Peterlin. 2003. Nef increases the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8460-8465.