

学位論文

HIV-1 ゲノム核移行に於ける LEDGF/p75 の役割

(Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene can overcome
the nuclear transport host-range barrier in mouse cells)

平成 23 年 12 月 博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

多田 卓哉

Abstract

抗 HIV-1 薬の開発に適したモデル動物の一つとしてマウスが考えられる。しかし、マウスでは種間障壁が存在しているため HIV-1 は感染しない。最近、宿主因子である LEDGF/p75 が HIV-1 インテグラーゼ (HIV-IN) の核移行、ならびに染色体の転写が活発な領域への HIV-1 ゲノムの組込みを促進させることが報告され、種間障壁となる因子である可能性が考えられた。

本研究ではヒト LEDGF/p75 を発現するトランスジェニックマウス (Tg) を作製し、Tg における HIV-1 感染効率を検討することで、LEDGF/p75 が HIV-1 感染における種間障壁克服のための鍵となり得る因子であるか検討した。

まず、CAG プロモーター制御下でヒト LEDGF/p75 を発現させるコンストラクトを作製し、マウス受精卵にマイクロインジェクションすることにより計 9 匹のファウンダーを作製した。ヒト LEDGF/p75 mRNA 及び、タンパク質の高発現が確認できた 3 系統の Tg (No.089、110、143) よりマウス繊維芽細胞 (MEF) を調製し、GFP-IN 遺伝子をトランスフェクションした後、GFP の細胞内分布を検討したところ、Tg MEF における GFP-IN の核局在効率が野生型 (WT) MEF と比べ上昇することが確認できた。また、Tg MEF における HIV-1 感染効率を VSV-G/HIV シュードタイプウイルスを用いて評価したところ、Tg MEF における感染効率が WT MEF に比べ有意に上昇することも確認できた。

このように、ヒト LEDGF/p75 の過剰発現により、マウス細胞における非効率的な GFP-IN の核局在効率及び、HIV-1 感染効率が上昇したことから、LEDGF/p75 は HIV-1 感染の種間障壁となる宿主因子の一つである可能性が示唆された。

Abstract

Attempts to create mouse models for AIDS have been hampered by species barriers in HIV-1 infection. We previously showed that the nuclear accumulation of HIV-1 preintegration complex (PIC) was suppressed in mouse cells. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF/p75) is a host factor identified as a binding partner of integrase (IN), and has been suggested to be involved in promoting viral integration by tethering PIC to the chromatin, which are observed as nuclear accumulation of IN by LEDGF/p75. Therefore, we here hypothesized that this host factor might act as one of the species-specific barriers in mouse cells. We generated transgenic (Tg) mice that constitutively express human LEDGF/p75. The GFP-fused IN was efficiently accumulated into the nucleus of human LEDGF/p75 expressing Tg mouse embryonic fibroblast (MEF) cells in contrast to the control WT MEF cells. Importantly, human LEDGF/p75 Tg MEF cells were significantly more susceptible to HIV-1 infection. These results suggest that LEDGF/p75 is one of host factors that constitute species barrier against HIV-1 in mouse cells.

目次

略号表	4
序論	5
材料と方法	9
結果	17
1. ヒト・マウス LEDGF/p75 の機能差の評価	
2. ヒト LEDGF/p75 Tg の作製	
3. ヒト LEDGF/p75 Tg の選別	
4. Tg 由来 MEF 細胞の作製及び、ヒト LEDGF/p75 の発現解析	
5. Tg MEF を用いた GFP-IN 細胞内局在の解析	
6. Tg MEF に於ける HIV-1 感染効率の評価	
考察	22
展望	25
図	26
参考文献	53
謝辞	60

略号表

AIDS	Acquired immune deficiency syndrome; 後天性免疫不全症候群
HIV	Human immunodeficiency virus; ヒト免疫不全ウイルス
IN	Integrase; インテグラーゼ
PIC	Preintegration complex; プレインテグレーション複合体
LEDGF	Lens epithelium-derived growth factor transcription coactivator; レンズ上皮由来増殖因子
IBD	Integrase binding domain; インテグラーゼ結合ドメイン
Tg	Transgenic mouse; トランスジェニックマウス
MEF	Mouse embryonic fibroblasts; マウス繊維芽細胞

序論

後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) 感染者は全世界で増加傾向が続き国際的に大きな問題となっている。現在、AIDS の根治療法は存在しないが、核酸系逆転写酵素阻害剤、非核酸系逆転写酵素阻害剤及び、プロテアーゼ阻害剤を組み合わせた多剤併用療法を用いることにより AIDS 発症は抑制することができるようになってきた。しかし、治療を行っていても HIV-1 複製に必要な酵素活性を抑制するだけで、体内からウイルスを根絶しているわけではないため、定期的な服薬の維持ができない場合、耐性ウイルスが生じること、多くの薬剤を使用するため重い副作用が起こること、さらに発展途上国では高額な薬剤費用のため十分な治療を行うことができないことなどが問題点として指摘されている。そのため、さらに効果的で安価な新規薬剤の開発が望まれており、その鍵となるのがモデル動物である。

HIV-1 はヒト以外ではチンパンジーにしか感染しないという特徴があるため現在、治療薬、ワクチン等の評価は HIV-1 と類縁関係が近いサル免疫不全ウイルス (SIV)、あるいは SIV と HIV-1 のキメラウイルスを用いてマカクザル等で行われている (Li et al., 1992; Joag et al., 1998)。しかしこれらのサルでは実験コストがかかる上、倫理、動物愛護の観点からも研究を進めづらい状況にある。ゆえに、より扱いやすいモデル動物が求められているが、マウスはその有力候補の一つである。マウスは上述した問題が比較的少ない上、遺伝子改変により分子生物学的解析が容易に行えるなどの利点がある。しかし、通常マウスには種間障壁が存在しているため HIV-1 は感染しない (図 1)。この原因としてヒトとマウスとのヘテロカリオンでは HIV-1 増殖が効率的になったという報告から、ヒト宿主因子が不足している可能性、マウス細胞において感染に対する阻害因子が存在している可能性が考えられる (Dragic et al., 1992; Mariani et al., 2001)。

宿主因子とはウイルスが増殖する際に必須とする細胞側の因子のことであり

(図 2)、ヒト側の宿主因子を同定し、遺伝子改変技術を用いてヒトの宿主因子を導入することにより、本来宿主としていない動物種の細胞内においてもウイルス増殖が可能となる (van Maanen and Sutton, 2003)。

HIV-1の感染は宿主細胞への侵入からインテグレーションまでの前期過程とそれ以降の後期過程に分類される (図2)。HIV-1感染において、種間障壁となっている主要な感染促進因子として挙げられるのが、細胞表面糖蛋白質のCD4 (Maddon et al., 1985;Lores et al., 1992) とケモカインレセプター群である (Berson et al., 1996;Feng et al., 1996)。その中でもケモカインレセプターはHIV-1のサブタイプにより結合親和性が異なり、T (T細胞) 指向性HIV-1が利用するCXCR4、M (マクロファージ) 指向性HIV-1が利用するCCR5が知られていた。

これまでに当研究室では HIV-1 感染に促進的に働く因子に着目し、ヒト CD4、ヒト CXCR4 または、ヒト CCR5 を発現するトランスジェニックマウス (Tg) を作製してきた。しかし、これらのマウスでは HIV-1 の細胞内侵入、逆転写は可能になったが、感染成立後の HIV-1 の産生は見られなかった (Tsurutani et al., 2007)。つまり、細胞内侵入後の過程で別の因子が不足している可能性が示唆された。そこで、逆転写酵素を欠損させた HIV-1 ゲノム Tg (HIV-Tg) を HIV-1 潜伏感染モデルとして用いることにより、HIV-1 の感染後期過程における効率を検討した結果、LPS 刺激によりマウス細胞内で HIV-1 産生が上昇することが分かった (Iwakura et al., 1992)。ところで、Jones らは HIV-1 が mRNA へ転写する際の転写因子である CyclinT と呼ばれる因子に着目し、HIV-1 に感染したマウス細胞へヒト CyclinT を加えたところ、細胞は HIV-1 mRNA を大量に産生したと報告した (Wei et al., 1998;Fujinaga et al., 1999)。そこで、ヒト CyclinT Tg を作製し、HIV-Tg と交配した結果、ヒト CyclinT 存在下で HIV-1 ビリオン産生量がさらに上昇することが分かった (Mariani et al., 2000)。つまり、HIV-1 の感染後期過程よりむしろ、HIV-1 の侵入後からインテグレーションまでのいわゆる感染前期過程において種間障壁が存在することが示唆されていた。

当研究室では HIV-1 感染、増殖の各過程の産物量を定量することでマウス細胞における HIV-1 増殖効率を検討した結果、マウス細胞に於ける HIV-1 pre-integration complex (PIC) の核移行効率がヒト細胞における核移行効率の 30% にすぎないことを見いだした (Tsurutani et al., 2007)。特に PIC の構成因子の一つである HIV-1 インテグラーゼ (HIV-IN) がヒト由来の HeLa 細胞では核局在を示すが、マウス由来の NIH3T3 細胞では細胞質局在を示すことから (図 3)、マウスに於ける種間障壁が HIV-IN の核移行過程にあることが示唆された。HIV-1 は増殖に際し、HIV-IN による宿主ゲノムへの組み込みが必要である。すなわち、HIV-IN の核移行が必要となる。これらのことより、HIV-IN の核、細胞質への局在は、核移行過程が成立しているかという指標になると思われる。NIH3T3 細胞では核局在を示さないという結果もマウス細胞において核移行過程において大きな障壁があるという結果を支持していると考えられる (図 4)。

HIV-IN の核移行及び、HIV-1 ゲノムのインテグレーションに必須と報告されている宿主因子として、Lens Epithelium-Derived Growth Factor (LEDGF) に着目した。LEDGF は最初、1998 年に RNA polymerase II と結合する転写促進因子として同定された (Ge et al., 1998b)。さらに、LEDGF mRNA は選択的スプライシングによって p75 と p52 の 2 種類の分子に翻訳されることが知られている (図 5A) (Ge et al., 1998a)。機能としては、RNA 転写促進に加え、プレ mRNA スプライシングにも関わっていること、熱、血清飢餓ストレスによるアポトーシスから細胞を保護することが報告されている (Singh et al., 1999)。LEDGF の各ドメインも明らかにされ (図 5A、B) (Cherepanov et al., 2004; Vanegas et al., 2005)、2003 年には LEDGF/p75 が IBD (Integrase binding domain) を介して HIV-IN と結合することが示された (Cherepanov et al., 2003; Maertens et al., 2003; Van Maele et al., 2006)。以後、多くの HIV-1 と LEDGF/p75 に関する報告がなされ、LEDGF/p75 によって HIV-IN の核移行、染色体への結合が可能になること (Maertens et al., 2003; Van Maele et al., 2006)、HIV-IN に結合することで細胞のプロテアソーム機

構による分解を回避できること (Llano et al., 2004b)、インテグレーション過程において、染色体のより転写が活発な領域への組み込みを促進する等の複数の知見が得られている (Bukrinsky, 2004; Ciuffi et al., 2005)。特に最近では、Emiliani らにより、LEDGF/p75 と結合できない変異体 IN を持つ HIV-1 を用いた解析から LEDGF/p75 がウイルス産生量に影響を及ぼすことが明らかにされた (Emiliani et al., 2005)。さらに Llano らは LEDGF/p75 を RNAi 法によって抑制したヒト細胞で HIV-1 感染効率の検討を行い、LEDGF/p75 が HIV-1 産生量、特にインテグレーション効率に影響を及ぼすことも明らかにした (Llano et al., 2004b)。従って、LEDGF/p75 が HIV-1 の核移行、インテグレーション及び、HIV-1 産生に深く関与していることが指摘された。

当研究室では LEDGF/p75 の HIV-1 増殖における機能を評価することにより、マウス細胞における HIV-1 増殖の非効率性を説明し得ないか検討した。つまり、ヒト LEDGF/p75 を過剰発現させた NIH3T3 細胞に哺乳類細胞への侵入が可能な VSV-G/HIV シュードウイルスを感染させたところ、感染性が上昇したことから、ヒト LEDGF/p75 が HIV-1 感染に影響を及ぼすと結論づけた (Tsurutani et al., 2007)。以上のことから HIV-IN 核移行、インテグレーション効率に必須の LEDGF/p75 をマウス細胞に導入することで、HIV-1 感受性マウスの樹立が期待される。

そこで、本研究では HIV-1 感染前期過程のヒト型化モデルマウスの作製を目指し、ヒト LEDGF/p75 遺伝子をマウス受精卵にマイクロインジェクションすることで Tg を作製することを試みた。この Tg を用いて HIV-1 の感染効率を評価することで、LEDGF/p75 が種間障壁克服のための鍵となり得る因子であるかどうかを検討することを目的とした。本研究により作製されたヒト LEDGF/p75 Tg は最終目的である新規 HIV-1 感受性モデルマウスとなることが期待される。

材料と方法

細胞

HeLa、293T、NIH3T3 細胞及び、MEF は DMEM (Life Technologies) に 10% FBS (SIGMA) を添加した培地を用いて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。MT4、BW5147 細胞は RPMI 1640 (Life Technologies) に 10% FBS (SIGMA) を添加した培地を用いて 37°C、5% CO₂ 下で培養した。LEDGF/p75 ノックアウト (KO) マウスより作製した MEF は A. Engelman 博士より供与していただいた (Shun et al., 2007)。

プラスミド

pNL-Luc-E-R+ (Env 欠損 HIV-1) 及び、vesicular stomatitis virus G (VSV-G) 発現プラスミドである pHIT/G は以下に記す (Fouchier et al., 1997; Tokunaga et al., 2001)。HIV-1 NL-Env 発現プラスミドである pNLnΔBS は以下に記す (Tokunaga et al., 2001)。GFP-IN 発現ベクターは以下に記す (Tsurutani et al., 2007)。ヒト LEDGF/p75 発現ベクターの作製は以下の通り行った。HeLa 細胞より採取した RNA を鋳型にして SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) を用いて cDNA を作成した。各プライマーは以下の通り。ヒト LEDGF/p75 forward; 5'-ACG AAT TCG CCA CCA TGA CTC GCG ATT TCA AAC CTG GAG ACC-3'、ヒト LEDGF/p75 reverse; 5'-CCG AAT TCT CAG TTA TCT AGT GTA GAA TCC TTC AGA GAT ATT TCA G-3'。PCR 産物は *EcoRI* 処理を行い、pCAGGS ベクター (Niwa et al., 1991) へ挿入した。得られたプラスミドはシーケンス解析を行い、変異が入っていないことを確認した。同様に、C 末に HA タグが付いた発現プラスミドは pCAGGS-3HA 発現ベクター (Iwabu et al., 2009) を使用して上記と同様に作製した。CD4/CXCR 発現プラスミド (pCa-CD4/CXCR4) は以下の通り作製した。CD4、CXCR4 及び、ECMV IRES は pNL-CD4、pNL-CXCR4 及び、pIRESpuro2 (Clontech) を鋳型として増幅した (Tokunaga et al., 2001)。これらの

PCR 産物は *KpnI/XhoI*, *XhoI/NotI* 及び、*NotI* 処理を行い、pCAGGS ベクター (Niwa et al., 1991) に挿入した。各プラスミドは NucleoBond Xtra (MACHEREY-NAGEL) を用いて説明書に従い抽出した。

ヒト・マウス LEDGF/p75 発現細胞の作製

LEDGF KO マウスより得られた MEF (Shun et al., 2007) はトランスフェクション前日に 2.5×10^5 個に合わせ培養した。トランスフェクションには 0.5 μg の hLEDGF/p75 もしくは mLEDGF/p75 発現ベクター (pCAGGS-LEDGF/p75-3HA)、0.5 μg の pCa-CD4/CXCR4 及び、5 ng の phRL-TK Renilla ルシフェラーゼ発現プラスミド (Promega) を Lipofectamine Plus Reagent (Invitrogen) を用いて説明書に従い行った。トランスフェクション後 3 時間培養した後、等量の DMEM (含 20% FBS) を添加し 48 時間培養した。

リアルタイム RT-PCR

MEF からの RNA 抽出は ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いて行った。リアルタイム RT-PCR は抽出した RNA を鋳型として One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) を用いて ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System により行った。ヒト LEDGF/p75 mRNA の検出には以下のプライマーを使用した。Forward primer; 5'-GAG AAA CAT CAA TGG ATT CTC GAC-3'、reverse primer; 5'-CTC AAT GCA TCT GTT CAC ATC AAG-3'。GAPDH の検出には以下のプライマーを使用した。Forward primer; 5'-GAT GCT GGC GCT GAG TAC G-3'、reverse primer; 5'-GCA GAG ATG ATG ACC CTT TTG-3'。ヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量は GAPDH の発現量で割ることで定量を行った。

マイクロインジェクション用 DNA 溶液の調製

10 μg のヒト LEDGF/p75 発現ベクターを *PvuI/HindIII/BamHI* を用いて処理し、

1.0% アガロースゲルで電気泳動した。3.87 kb の目的バンドは GeneClean III Kit (Q-BIOgene) を用いて精製した。TE に懸濁後、フェノール・クロロホルム処理を行なった。エタノール沈殿後、T₁₀E_{0.25} 溶液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5)、0.25 mM EDTA) に懸濁後、吸光度と電気泳動を行い、DNA 濃度を測定し、500 DNA 分子/pl (2.13 ng/μl) になるよう調製した。

マウス飼育条件

交配用雄マウス、採卵用雌マウスには 3~8 週齢の C3H/HeN (日本 SLC) を、偽妊娠用 (仮親) 雌マウスには 6~15 週齢の ICR (日本 SLC) を用意した。マウスは交尾の時間を制御するために飼育室の明暗を照明で、明期を 8~20 時、暗期を 20~8 時にコントロールし、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育された。全ての実験は実験動物使用のための倫理ガイドラインに従って行った。

マイクロインジェクション

採卵用 (C3H/HeN) 雌マウスは採卵 3 日前の 16 時に 5 IU の PMS (三共臓器) を腹腔内投与した。採卵前日の 16 時に 5 IU の hCG (三共臓器) を腹腔内投与し、雄マウス (C3H/HeN) と 1 対 1 で交配した。自然発情している偽妊娠用 (仮親) 雌マウス (ICR) を採卵前日に精管結紮マウスと 1 対 1 で交配した。翌日朝、交尾確認をした採卵用雌マウスより卵管を採取し、300 μg/ml のヒアルロニダーゼ (SIGMA) を含む M2 培地 (SIGMA) に入れた。卵丘細胞を除いた受精卵は M16 培地に移し 37°C、5 % CO₂ 条件下で受精卵を培養した。電動インジェクター (IM-300 ナリシゲ) を使用してマウス受精卵前核にインジェクションを行った。DNA を注入し終わった卵は M16 培地に移し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。朝交尾確認した偽妊娠マウス (ICR) にネンブタール (ダイナボット) を腹腔内投与し、麻酔をかけた。偽妊娠マウスの卵管開口部と卵管膨大部の間にマイクロインジェクションした受精卵を移植した。

サザンブロッティング

生後3週のマウスから尾を1~2 cm切り取り、0.5 mg/mlのProtease K (SIGMA) を含むSTE緩衝液を加え55°C、1晩シェーキングオーブンに入れ、尾を溶かした。DNAは全自動核酸分離装置 (Kurabo) を用いて抽出した。10 µgのゲノムDNAはHincII/PstIで処理した。エタノール沈殿を行った後、1%アガロースゲルを用いて25 Vで15時間、電気泳動した。ゲルを0.25 NのHClで15分間振盪した後、0.2 N NaOH、1.5 M NaClで30分間変性させた。水道水でよく洗浄した後、ゲルを0.5 M Tris-HCl (pH7.5)、1.5 M NaClで30分間振盪した。トランスファーを行った後、メンブレンはその後、150 mJouleのUVでクロスリンクした。ハイブリダイゼーション溶液 (5×SSCP、5×Denhardt溶液、50% formamide、1% SDS、0.25 mg/ml サケ精子 DNA) を用いて42°Cで1晩、プレハイブリダイゼーションした後、プローブ (1×10⁷ cpm) を用いて42°Cで1晩ハイブリダイゼーションした。洗浄液 (2×SSC、1% SDS) を用いて42°Cで15分洗浄した後、洗浄液 (0.1×SSC、1% SDS) を用いて65°Cで30分間洗浄した。BAS imaging plate (FujiFilm) に1晩暴露し、FLA 5100 (FujiFilm) で解析した。プローブは10 µgのpCAGGSベクターを10 unitsのPstI/EcoRIで処理を行った。1%アガロースゲルで電気泳動しrabbit-β-globin polyA部 (541 bp) を切り出し、GeneClean III Kitを用いて精製した。調製したDNAはMultiprime DNA labeling system (Amersham) を用いて³²Pで標識した。

ジェノタイピング

PCR反応液には尾のライセートを超純水で100倍希釈したものを鋳型として使用した。各プライマーは以下の通り。ヒトLEDGF/p75 forward; 5'-GAA GGA ACA AAC AGG GTC AAA GAC-3'、ヒトLEDGF/p75 reverse; 5'-GGC ATA TGT TGC CAA ACT CTA AAC C-3'、IL-16 forward; 5'-CTA TTG AGC AAT GCA GTG GGT

GTT GT-3', IL-16 reverse; 5'-GAC ATG TGA GTC AGC TGG ATA TGG A-3'. IL-16 は内在性コントロールとして使用した。

マウス解剖及び、RNA 回収

8 週齢のマウスから胸腺、脾臓、リンパ節、マクロファージ (Mφ)、大腸、小腸を採取した。Mφ は 4% TGC (thioglycollate) を 2 ml ずつ投与したマウスの腹腔内から、投与 3 日後 1×PBS を用いて回収した (Saijo et al., 2007)。各組織は、はさみで細かく切断後、1×PBS を用いて洗浄、遠心した。ペレットにした細胞に D-solution (0.2% 酢酸ナトリウム、50% 水飽和フェノール、20% CHCl₃/IAA) を入れ、21G 針を用いてよく懸濁した。遠心後、上清を採取し 0.2 M 酢酸ナトリウム-水飽和フェノール、CHCl₃/IAA 液を加え 15 分間氷上に放置した。遠心後、上清を採取し同量のイソプロパノールを加え -20°C で 1 晩放置した。遠心後、沈殿物に D-solution、フェノール、CHCl₃ を加え遠心した。エタノール沈殿を行った後、超純水に溶解した。

ノザンプロットティング

10 µg の RNA は 1% アガロースゲルを用いて 25 V で 15 時間、電気泳動した。トランスファーを行った後、メンブレンを UV クロスリンクした。5×SSC、5×Denhardt 溶液、50% formamide、1% SDS、200 µg/ml サケ精子 DNA を用いて 42°C で 1 晩、プレハイブリダイゼーションした後、プローブ (1×10⁷ cpm) を用いて 42°C で 1 晩ハイブリダイゼーションした。2×SSC、1% SDS を用いて 42°C で 15 分洗浄した後、0.1×SSC、1% SDS を用いて 65°C で 30 分間洗浄した。BAS imaging plate に 1 晩暴露し、FLA 5100 で解析した。プローブはヒト LEDGF/p75 発現ベクターを鋳型とした PCR により作製した。各プライマーは以下の通り。
ヒト LEDGF/p75 forward; 5'-ACG AAT TCG CCA CCA TGA CTC GCG ATT TCA AAC CTG GAG ACC-3'、ヒト LEDGF/p75 reverse; 5'-CCG AAT TCT CAG TTA

TCT AGT GTA GAA TCC TTC AGA GAT ATT TCA G-3'。PCR 産物を GeneClean III Kit を用いて精製後、Multiprime DNA labeling system を用いて ^{32}P で標識した。

ウェスタンブロッティング

培養した細胞は上清を除き、RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、1% NP-40、0.5% Na-deoxycholate、150 mM NaCl、0.1% SDS) を加えた。−80°C で 10 分間静置した後、細胞溶解液は等量のサンプルバッファー (125 mM Tris HCl、4% SDS、20% glycerol、10% 2-mercaptoethanol、0.004% bromphenol blue) に懸濁し、100°C で 5 分間静置した。10% アクリルアミドゲルを使用して SDS-PAGE 電気泳動を行った。電気泳動後、PVDF メンブレン (Millipore) へのブロッティングを行った。ブロッティング後、Immuno Block (DS pharma biomedical) を使用して 1 時間、ブロッキングを行った。メンブレンはさらに 2000 倍に希釈した一次抗体反応液 (anti-hLEDGF/p75 抗体もしくは anti-HA 抗体 (各 BD Biosciences)) で 1 時間反応させた後、5000 倍に希釈した二次抗体反応液 (anti-mouse IgG-HRP) で 1 時間反応させた。発色には ECL (Bio-Rad) を使用して LAS-3000 imaging system (FujiFilm) により検出を行った。

MEF の作製

妊娠 13.5 日の胎児の頭及び、内臓を除き、1×PBS 中で細かく切断した。0.1% トリプシンに懸濁し、ガラスビーズ入りのフラスコに入れ、37°C で 20 分間攪拌した。等量の MEF 用培地を加えメッシュで濾過後、遠心した。MEF 用培地は DMEM に 10% FBS、1×non-essential amino acids (Gibco BRL)、1 mM sodium pyruvate (Gibco BRL)、50 U/ml ペニシリン、50 µg/ml ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。上清を除いた後、細胞は 1×10^7 個に合わせ、あらかじめゼラチンコートしていた 15 cm dish に撒き、37°C、5% CO₂ 下で培養した。

GFP-IN の細胞内局在の観察

HeLa、NIH3T3 細胞、MEF はトランスフェクション前日に 2×10^4 個に合わせ 8 well chamber で培養した。トランスフェクションに使用する DNA は GFP-IN (GFP-Integrase 発現ベクター) を使用した (Tsurutani et al., 2007)。トランスフェクションは 0.8 μg の DNA (GFP-IN) と 2 μl の Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて説明書に従い行った。4 時間後、培地を交換した。培養 2 日後、細胞をアセトンで 5 分間固定し、500 ng/ml の hoechst で核を染色後、レーザー共焦点顕微鏡 A1 (Nikon) を使用し、観察、撮影を行った。

シュードウイルス作製

CXCR4 指向性ウイルスは以下の通り作製した。293T 細胞に FuGENE6 (Promega) を使用して pNL-Luc-E-R+, pNL Δ BS 及び、空ベクターをコトランスフェクションした。VSV-G/HIV シュードウイルスは以下の通り作製した。293T 細胞に FuGENE6 を使用して pNL-Luc-E-R+, pHIT/G をコトランスフェクションした。48 時間後、各上清は 37.5 units/ml の DNase I (Roche Applied Science) で 37°C、30 分間処理を行った。上清回収後、p24 量は HIV-1 p24-antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Advanced BioScience Laboratories) を使用して定量を行った。

HIV-1 感染実験

ヒト LEDGF/p75 及び、マウス LEDGF/p75 を一過性に発現させた細胞は 96 穴プレートに 1×10^4 個を撒き、2 時間培養した。1 ng (p24 量) の CXCR4 指向性 HIV-1 を感染させた。感染 48 時間後、細胞は 100 μl の Passive Lysis Buffer (Promega) に懸濁し室温で 10 分静置した。−80°C で凍結、室温で溶解後、25 μl の細胞溶解液を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性の測定には LB 960 Microplate Luminometer (Berthold Technologies) を使用した。HIV-1 感染効

率は Firefly ルシフェラーゼの活性値を Renilla ルシフェラーゼの活性値で割ること
とで評価した。Tg MEF における感染実験では 200 pg (p24 量) の VSV-G/HIV シ
ュードウイルスを感染させた。感染 48 時間後、細胞は 100 μ l の Passive Lysis
Buffer に懸濁し室温で 10 分静置した。−80°C で凍結、室温で溶解後、25 μ l の
細胞溶解液を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼ活性の
測定には LB 960 Microplate Luminometer を使用した。

感染効率の評価

感染効率の評価は *student's t-test* により検定を行った。検定は $P < 0.05$ で有意差
があると判断した。

結果

1. ヒト・マウス LEDGF/p75 の機能差の評価

ヒト、またはマウス LEDGF/p75 の HIV-1 感染における機能差を評価するため、C 末に HA タグがついた hLEDGF/p75 発現プラスミド (HA-hLEDGF/p75)、または mLEDGF/p75 発現プラスミド (HA-mLEDGF/p75) を作製した。各プラスミドの発現は 293T 細胞にトランスフェクションを行い、抗 HA 抗体を使用したウェスタンブロッティングにより評価した。その結果、図 6A に示すように、293T 細胞においてヒト、またはマウス LEDGF/p75 タンパク質の発現が確認できた。

さらに HIV-1 感染実験を行うため、以下の通り細胞を調製した。LEDGF/p75 KO マウスより作製した MEF に HA-hLEDGF/p75 もしくは HA-mLEDGF/p75、CD4/CXCR4 発現プラスミド及び、phRL-TK Renilla ルシフェラーゼ発現プラスミドのコトランスフェクションを行った。このヒト、またはマウス LEDGF/p75 発現細胞に CXCR4 指向性ウイルスを感染させ、ルシフェラーゼアッセイを行うことで HIV-1 感染効率を評価した。その結果、ヒト LEDGF/p75 発現細胞における HIV-1 感染効率はマウス LEDGF/p75 発現細胞と比較して有意に上昇することが明らかとなった (図 6B)。

以上の結果から、HIV-1 感染においてヒト LEDGF/p75 はマウス LEDGF/p75 に比べ、より効率的に機能する可能性が示唆された。

2. ヒト LEDGF/p75 Tg の作製

ヒト LEDGF/p75 をマウスに導入することで HIV-1 感受性マウスが作製できる可能性が考えられた。そこで今回、ヒト LEDGF/p75 発現ベクターとして、哺乳類細胞における強力な発現プロモーターである CAG プロモーター制御下でヒト LEDGF/p75 を全組織非特異的に発現させるコンストラクトを作製した (図 7)。合計 3030 個のマウス受精卵 (C3H/HeN) にマイクロインジェクションを行った

結果、188匹の仔マウスが誕生した(表1)。

誕生した仔マウスにヒト LEDGF/p75 が導入されているか確認するため、マウスの尾から抽出したゲノム DNA を用いてサザンブロッティングを行った。トランスジーンを検出にはヒト LEDGF/p75 発現ベクターに特異的である β -globin プロンプを使用した。その結果、離乳した仔マウスの 5.5% にあたる計 9 系統のマウス(系統番号; No.004, 005, 008, 015, 062, 089, 110, 129, 143) でヒト LEDGF/p75 遺伝子と思われるバンドが検出された(図 8A, B)。これらの 9 系統のマウスはヒト LEDGF/p75 発現ベクターに特異的なプライマーを使用した PCR でもバンドが検出できたため、目的としていたヒト LEDGF/p75 の遺伝子が導入されたファウンダー(ヒト LEDGF/p75 Tg) が得られたことが分かった(表 1)。

仔マウス(F1)を得るため、ファウンダーを WT と交配させた。誕生後 3 週齢の F1 を離乳し、尾ライセートを鋳型とした PCR によりスクリーニングを行った。その結果、トランスジーンであるヒト LEDGF/p75 遺伝子は通常のメンデル遺伝に従って伝達されることが分かった。つまり、ヒト LEDGF/p75 遺伝子は今回作製した全 9 系統の Tg の生殖系列へ正常に伝播したことが分かった。また、ヒト LEDGF/p75 Tg は外見的にも WT との違いは見られず、正常であった。

以上の結果から、ヒト LEDGF/p75 遺伝子が導入された Tg が得られ、表現型も正常である事が分かった。

3. ヒト LEDGF/p75 Tg の選別

得られた 9 系統の Tg におけるヒト LEDGF/p75 の発現を確認するため、ノザンブロッティングを行い、ヒト LEDGF/p75 mRNA の発現解析を行った(図 9A, B)。発現解析には F1 の胸腺、脾臓、リンパ節、TGC 誘導マクロファージ(M ϕ)、大腸、小腸の組織から採取した RNA を使用した。

その結果、No.004, 008, 015 Tg では胸腺、大腸においてヒト LEDGF/p75 mRNA の発現が確認できた。また、No.005 Tg については胸腺のみ、No.062 Tg では胸

腺、大腸、小腸、No.129 Tg ではリンパ節のみでのヒト LEDGF/p75 mRNA の発現が確認できた。一方、No.110、143 Tg では胸腺、脾臓、大腸、小腸、さらに No.089 Tg では今回確認した全ての臓器でヒト LEDGF/p75 mRNA の発現が確認できた (図 9B)。

今回は以下の基準に合うものについて Tg を選別した。

- ① 様々な臓器、特に胸腺、脾臓、Mφ においてヒト LEDGF/p75 mRNA の発現が認められる系統。
- ② ヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量がより高い系統。

これらの基準に合うものとして、今回は No.089、110、143 の 3 系統の Tg に絞り、今後の実験を行うことにした。そこで、まずこれら 3 系統の Tg におけるヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量を β -actin mRNA の発現量 (図 10A) で補正し、ヒト細胞と比較した (図 10B)。図 10A に示すように、ポジティブコントロールとして使用した MT4 細胞ではヒト LEDGF/p75 mRNA のバンドは UTR (U 非翻訳領域) を含むため 2.1 kb に検出されるが、今回作製した Tg のトランスジーン中には UTR は含まれていないため、ヒト LEDGF/p75 mRNA は 1.6 kb に検出された (図 10A)。その結果、No.089 Tg ではヒト細胞である MT4 細胞と比較してほぼ同程度のヒト LEDGF/p75 mRNA の発現が確認できた。一方、No.110、143 の 2 系統については、ヒト LEDGF/p75 mRNA は特に脾臓での発現が高いことが分かった。

以上、今回得られた Tg ではヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量に差異はあるものの、ヒト LEDGF/p75 の高い発現が確認できた 3 系統のマウスに絞ることができた。

4. Tg 由来 MEF の作製及び、ヒト LEDGF/p75 の発現解析

今回は評価のしやすさから、MEF を使用して GFP-IN の細胞内局在を評価することにした。まず、ヒト LEDGF/p75 mRNA の高い発現が確認できた 3 系統の

Tg (No.089、110、143) から MEF を作製した (図 11)。これらの Tg MEF においてヒト LEDGF/p75 mRNA が発現しているか否か確認するため、リアルタイム RT-PCR を行った (図 12A)。その結果、各 Tg MEF (No.089、110、143) においてヒト LEDGF/p75 mRNA が発現していることが確認できた (図 12A)。

また、ウェスタンブロッティングを行い、抗ヒト LEDGF/p75 抗体により各 Tg MEF におけるヒト LEDGF/p75 タンパク質の発現を確認した。その結果、3 系統全ての Tg MEF (No.089、110、143) においてヒト LEDGF/p75 タンパク質の発現が確認できた (図 12B)。

以上の結果より、今回選択した 3 系統の Tg より作製した MEF において、ヒト LEDGF/p75 mRNA 及び、ヒト LEDGF/p75 タンパク質の発現を確認することができた。

5. Tg MEF を用いた GFP-IN 細胞内局在の解析

WT 及び、Tg MEF での GFP-IN の細胞内局在の検討は目安として各 100 個の細胞を対象にして GFP-IN の細胞内局在を検討することにした (図 13)。GFP-IN の細胞内局在は顕微鏡下で核内と細胞質内の GFP-IN の存在比を比較することで行った。つまり、GFP の蛍光強度が核内の方で強いと判断したときは (N; 核 > 細胞質) に分類した。また、GFP の蛍光強度が細胞質側に強いと判断したときは (C; 核 < 細胞質) に、核内と細胞質内での GFP の蛍光強度が同程度と判断したときは (N/C; 核 = 細胞質) に分類した (図 14A)。その結果、WT MEF では C 及び、N/C がほぼ同程度の割合で確認できた (各 29.1%、56.7%)。一方、N の割合は 14.2% であった (図 14B、表 2)。

一方、各 Tg MEF について検討した結果、N の割合は No.089 Tg MEF で 70.8%、No.110 Tg MEF で 49.5%、No.143 Tg MEF で 65.7% であった。また、WT MEF で特に多かった C、N/C の割合は各 Tg の細胞で減少していた (図 14B、表 2)。

以上の結果から、ヒト LEDGF/p75 の過剰発現により、マウス細胞における非

効率的な GFP-IN の核局在効率が上昇したことが分かった。

6. Tg MEF に於ける HIV-1 感染効率の評価

Tg MEF (No.089、110、143) における HIV-1 感染効率は、VSV-G/HIV シュードウイルスを感染させ、48 時間後にルシフェラーゼアッセイを行うことで評価した。Tg、KO 及び、WT MEF における HIV-1 感染効率を評価した結果、3 系統の Tg MEF (No.089、110、143) における HIV-1 感染効率が WT MEF に比べ有意に上昇したことが明らかとなった (図 15)。

以上の結果から、ヒト LEDGF/p75 の過剰発現により、マウス細胞における非効率的な HIV-1 感染効率が上昇することが明らかとなった。

考察

本研究により LEDGF/p75 が HIV-IN の核局在に大きな役割を果たしていることが明らかとなり、マウス細胞における核移行過程における障壁の一部は、マウス LEDGF/p75 の HIV-IN 核移行に関わる機能が劣るためである可能性が示唆された。

現在までヒト LEDGF/p75 が影響を及ぼしている HIV-1 感染サイクルのステップとして核移行 (Tsurutani et al., 2007)、あるいはインテグレーション (Llano et al., 2004b; Emiliani et al., 2005; Llano et al., 2006) の 2 つの可能性が考えられ、それぞれ異なる結論が示されていた (図 16)。今回、HeLa、NIH3T3 細胞における GFP-IN の細胞内局在を検討した結果、ヒト細胞では 93.1% の細胞で GFP-IN が核局在を示したのに対し、マウス細胞では GFP-IN が核局在を示した細胞は 30% という結果を得た (図 3、図 14、表 2)。当研究室では HeLa、NIH3T3 細胞における LEDGF/p75 の発現量をリアルタイム PCR またはウェスタンブロッティングにより比較した結果、LEDGF/p75 の発現量に差は見られなかった。つまり、HIV-IN 核移行障害の原因は、LEDGF/p75 の発現量の違いではなく、マウス LEDGF/p75 の HIV-1 に関する機能が劣るためである可能性が考えられる。

ここで想定しうる機能差としては、HIV-IN に対する結合親和性、LEDGF/p75 自体の核移行効率などが考えられるが、ヒト LEDGF/p75 とマウス LEDGF/p75 のアミノ酸配列は 92.6% という極めて高い相同性を保持している (図 5B)。さらに LEDGF/p75 中の HIV-IN が結合するとして特定されたドメインである IBD、核移行シグナル (NLS)、染色体が結合するドメイン (PWWP、AT hook) などとは全く同じ配列を保持していること、マウス LEDGF/p75 であっても過剰発現させることにより HIV-IN の核局在を誘導できたことなどから (data not shown)、マウス LEDGF/p75 の HIV-1 感染に関する機能の低下は、LEDGF/p75 の核移行機能の低下によるものではなく、HIV-IN とマウス LEDGF/p75 の結合親和性の低下に

よる可能性が高い。実際、当研究室では、GST-LEDGF/p75 とタグを切断した LEDGF/p75 を用いてヒト、マウス LEDGF/p75 の競合的プルダウンアッセイを行った結果、ヒト LEDGF/p75 はマウス LEDGF/p75 に比べ HIV-IN への親和性が高いことが示唆できる結果を得ている。

その原因として、マウス LEDGF/p75 にも IBD が存在するものの、高次構造を形成した際の HIV-IN との結合親和性が低い可能性が考えられる。また、Colon 26 という他のマウス細胞株においてもインテグラーゼの細胞質局在が見られたことから (Tsurutani et al., 2007)、NIH3T3 特異的に LEDGF/p75 に変異が入ったためにこのような現象が起きた可能性もないと考えている。

別の可能性として、LEDGF/p75 は細胞内で別の因子との結合により HIV-IN との結合が阻害されていることも考えられる。

本研究では、ヒト LEDGF/p75 による HIV-IN 核局在効率の上昇及び、HIV-1 感染効率の上昇が個体レベルにおいてみられるかを明らかにするため、ヒト LEDGF/p75 Tg を作製した。Tg MEF ではヒト LEDGF/p75 の発現量が低いにもかかわらず、GFP-IN が核局在を示した (図 14、表 2)。また Tg MEF において、ヒト LEDGF/p75 の発現量と GFP-IN の核移行効率に相関関係が見られることから、ヒト LEDGF/p75 が HIV-IN の核局在に大きく関与していることが示された。実際、HIV-1 感染にヒト LEDGF/p75 が影響を与えているか評価した系において (Llano et al., 2004b)、RNAi 法により核抽出液からもヒト LEDGF/p75 が検出されないほど完全に抑制した細胞では HIV-1 増殖が抑制されることが報告されている。このことは本研究により示された、わずかなヒト LEDGF/p75 でも HIV-IN 核移行効率に影響を及ぼすという結論と一致するものと考えている。

また、HIV-1 は染色体 DNA 上の転写ユニット内に指向性が高いことが知られている (Emiliani et al., 2005)。この HIV-1 の組み込み部位の選択にも LEDGF/p75 が関与している可能性が報告されている (Llano et al., 2004a; Emiliani et al., 2005; Llano et al., 2006)。この過程においてもヒト、マウス LEDGF/p75 の機能差

が存在する可能性が考えられる。実際、本研究では LEDGF/p75 が核移行、インテグレーションのどちらに大きく関与しているかは検討できていない。

そこで、ヒト LEDGF/p75 Tg においてシュードウイルス (D116G ; IN に変異) を用いて感染実験を行い、逆転写産物及び、2-LTR 産物を測定する必要がある。さらにシュードウイルス (IN に変異なし) を使用してインテグレーション効率も検討する必要がある。インテグレーション産物はゲノム上の未知領域を特異的に増幅させる LA PCR システム (Tsurutani et al., 2007)、またはマウス特異的な配列 (B1、B2、LINE 配列) のプライマーを利用した BBL-PCR (Shun et al., 2007) を用いて検討できると考えている。そして、それぞれ核移行産物/逆転写産物とインテグレーション産物/核移行産物を比較検討することで、LEDGF/p75 が核移行、インテグレーションのどちらのステップに大きく関与しているか証明できると考えている。

さらに、今回作製した Tg における HIV-1 感染効率を実際の感染細胞である T 細胞、マクロファージ等、さらには個体レベルでの HIV-1 感染実験を行い評価する必要があると考えている。

現在、HIV-1 に対するヒト型化マウスとしては Rag2^{-/-};Il2Rg^{-/-} (Traggiai et al., 2004) や BLT マウス (Denton et al., 2008) を使用した系が行われているが、これらのマウスでは HIV-1 に対する免疫反応が不十分なこと (Baenziger et al., 2006; An et al., 2007)、胎児組織を使用しているため実験系の施行が困難などの問題点がある。一方、トランスジェニックマウスでは安価であり、他の Tg との掛け合わせも容易で、高い目的遺伝子の発現により明確な表現型が見られるなどの利点があると考えている。

展望

今回の結果からヒト LEDGF/p75 は HIV-IN の核局在に大きく寄与することが示された。つまり、ヒト CD4/CXCR4/LEDGF/p75 Tg、ヒト CD4/CCR5/LEDGF/p75 Tg を作製することで、実際のウイルスを使用して HIV-1 感染が評価できると考えている。これらの Tg において HIV-IN 核局在またはインテグレーション、その他の過程に促進が認められるなら、マウスにおいて HIV-1 感染前期過程が成立すると期待される。その後はマウス個体内で感染前期過程・後期過程共に感染が成立する完全な感受性マウス作製に向け、感染後期過程に関する因子や、感染に抑制的に働く因子にも着目していく必要がある。特に、後期過程における重要な因子として CyclinT という因子に着目している。

これまでに当研究室では、ヒト CyclinT Tg のマクロファージを用いて HIV-1 感染効率を検討した。その結果、ウイルス由来タンパク質で転写促進因子である Tat や、翻訳に関わる Rev 活性の上昇が見られたことから、この因子の HIV-1 のタンパク質産生への関連が示唆されている。今後はヒト CD4/CXCR4/LEDGF/p75 Tg、ヒト CD4/CCR5/LEDGF/p75 Tg と交配させることで、感染前期・後期過程を統括した Tg が得られるものと期待される。

さらに、マウス細胞内でも APOBEC3G (Yu et al., 2003) のような HIV-1 感染に抑制的に働く因子が存在するか検索していく必要があり、これらの因子の KO マウスを作製することが必要になる可能性もある。最近では RNAi を用いたスクリーニングにより、網羅的に HIV-1 感染に関する宿主因子が同定されている (Brass et al., 2008;Konig et al., 2008;Zhou et al., 2008)。それらの因子に対してマウス細胞内に於ける実際の機能を評価する必要があると考えている。以上の Tg は他の遺伝子改変マウスと交配することが可能で、分子生物学的解析が容易に行える利点があり、今後は病態形成に関与する因子との相互作用を個体レベルで解析できることが考えられる。

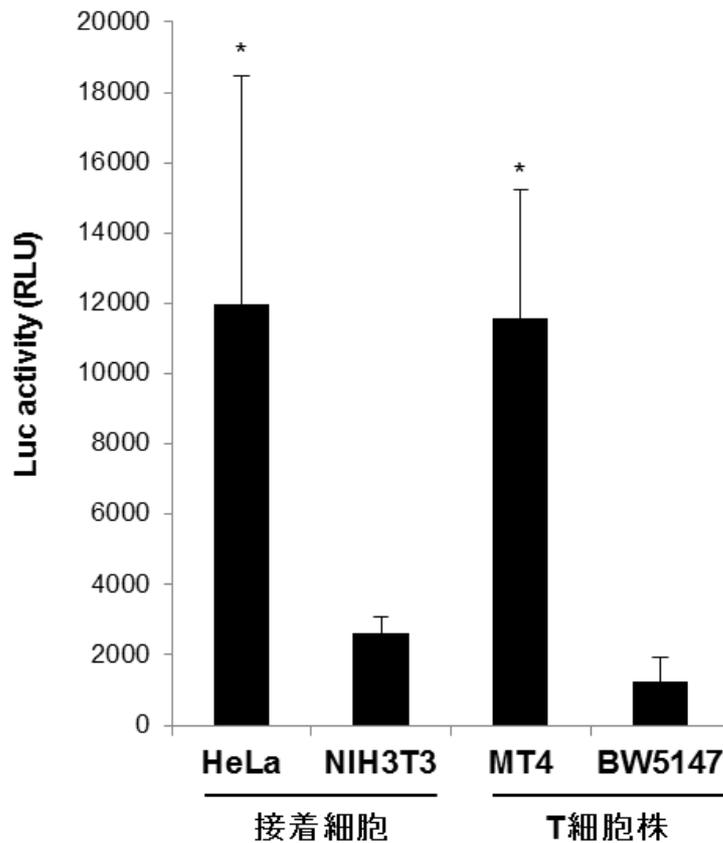


図1 ヒト、マウス細胞における HIV-1 感染効率の評価

ヒト細胞及び、マウス細胞における HIV-1 感染効率を VSV-G/HIV シュードウイルスを使用して評価した。ヒト細胞として HeLa、MT4 細胞を、マウス細胞として NIH3T3、BW5147 細胞を使用した。VSV-G/HIV シュードウイルス感染 48 時間後の感染効率をルシフェラーゼアッセイにより評価した。各々の感染効率は *student's t-test* による検定を行った。* $P < 0.01$ 。

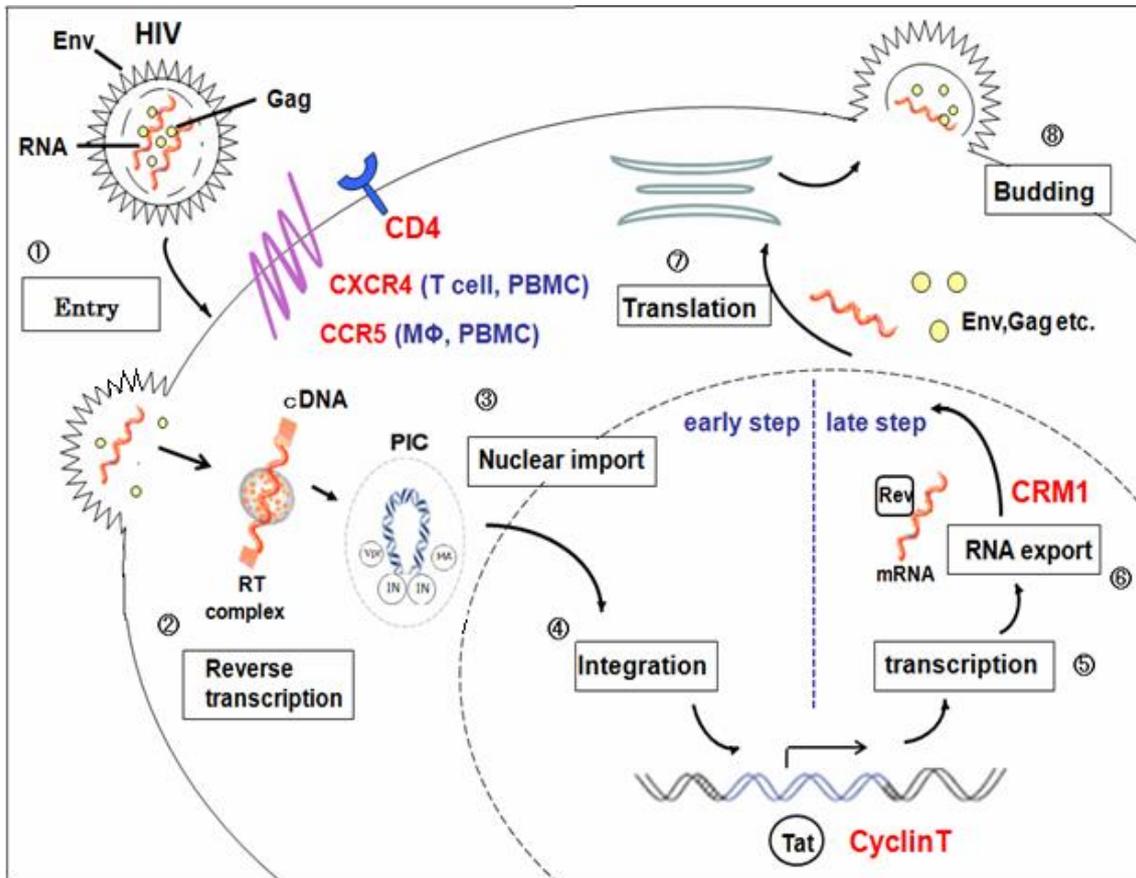


図2 HIV-1 感染サイクルと宿主因子

ヒト細胞において、HIV-1 はそれぞれ①～⑧の順で感染を成立させる。感染サイクルは、HIV-1 の細胞への吸着からインテグレーションまでの前期過程と、HIV-1 の発現から HIV-1 粒子放出までの後期過程に分類される。各過程で特に重要となる宿主因子をそれぞれ赤字で示す。

1. HIV-1 は、標的となるヒト細胞上に発現している CD4、CXCR4 または CCR5 に付着して侵入する。
2. 逆転写複合体 (RT complex) を形成し、逆転写酵素により DNA を合成する。

3. HIV-1 ゲノムは様々な宿主因子と共に PIC (preintegration complex) 複合体を形成し、核膜孔複合体を介して核内へ移行する。
4. HIV-1 タンパク質である IN を使用して HIV-1 ゲノムは宿主ゲノムに組みこまれる。
5. HIV-1 ゲノムは宿主側の転写システムにより mRNA に転写される。
6. RNA はプロセッシングを受けた後、核外へと輸送される。
7. 新しい HIV-1 タンパク質(Gag、Pol、Env など) へと翻訳される。
8. HIV-1 は出芽した後、成熟 HIV-1 になる。

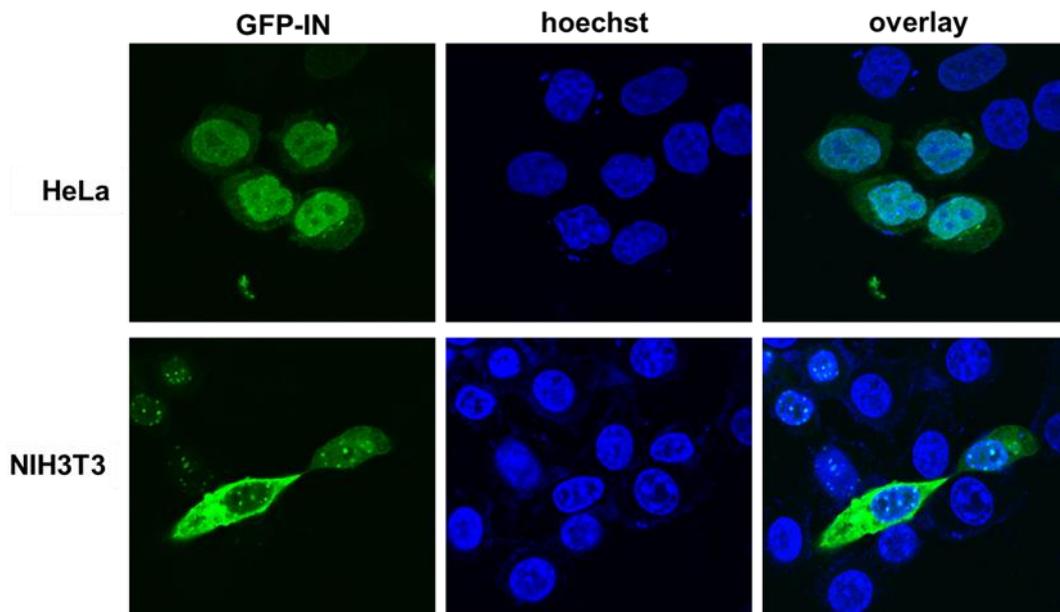


図 3 HeLa、NIH3T3 細胞における GFP-IN の細胞内局在

Lipofectamine 2000 を使用して HeLa、NIH3T3 細胞に GFP-IN をトランスフェクションした。各細胞における GFP-IN の細胞内局在の一部を示す。緑：GFP-IN、青：hoechst。

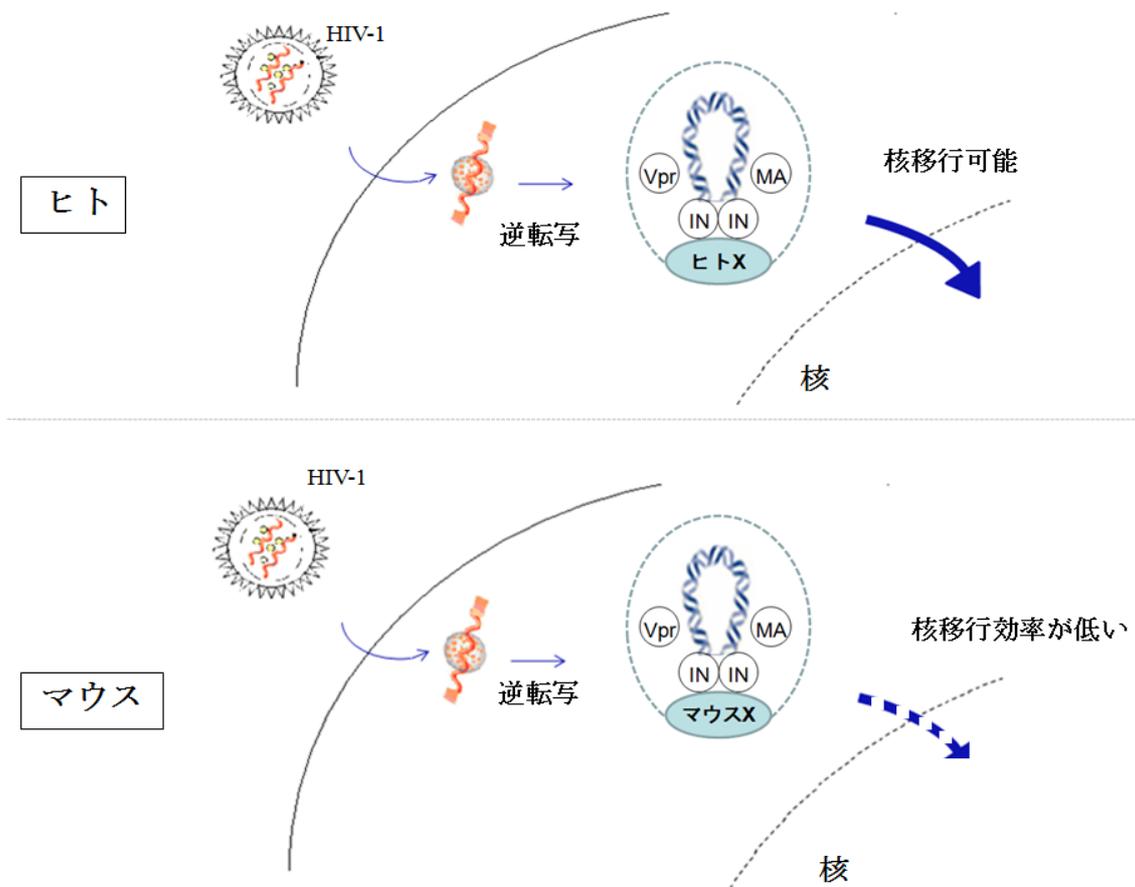
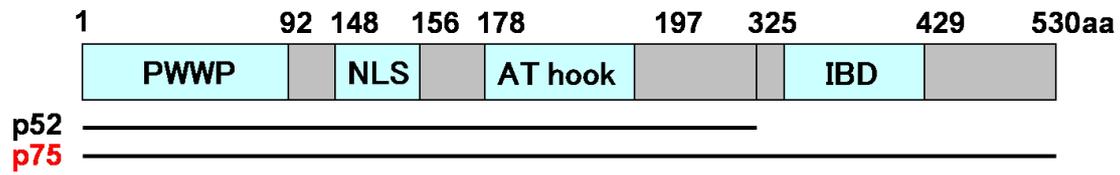


図4 ヒト及び、マウス細胞における PIC 核移行効率の違い

マウス細胞では PIC の核移行のステップに障壁がある可能性が考えられる。PIC の核移行には宿主側の因子が必要と考えられる。PIC には HIV-1 ゲノム、HIV-IN、MA、Vpr 等の HIV-1 タンパク質、その他、宿主側の因子が含まれる。

(A)



(B)

ヒト MTRDFKPGDL IFAKMKGYPH WPARVDEVPD GAVKPPTNKL PIFFFGTHET AFLGPKDIF PWWP domain

マウス MTRDFKPGDL IFAKMKGYPH WPARVDEVPD GAVKPPTNKL PIFFFGTHET AFLGPKDIF

YSENKEYGK PNKRKGFNEG LWEIDNNPKV KFSSQQAATK QSNASSDVEV EEKETSVSKE

YSENKEYGK PNKRKGFNEG LWEIDNNPKV KFSSQQASTK QSNASSDVEV EEKETNVSKE

NLS
DTDHEEKASN EDVTKAVDIT TPKAARRGRK RKAEKQVETE EAGVVTATA SVNLKVS PKR AT hook
*** . *****
DTDQEEKASN EDVTKAVDIT TPKAARRGRK RKAEKQVDTE EAGMVTAATA S- NVKASPKR

GRPAATEVKI PKPRGRPKMV KQPCPSESDI ITEEDKSKKK GQEEKQPKKQ PKKDEEGQKE

GRPAATEVKI PKPRGRPKVV KQPCPSD GDM VIDEDKSKKK GPEEKQPKKQ LKKEE EGQKE

EDKPRKEPDK KEGKKEVESK RKNLAKTGVT STSDSEEEGD DQEGEKRRKG GRNFQTAHRR
* . *****
EEKPRKEPDK KEGKKEVESK RKNLAKPGVT STSDSEDE - D DQEGEKRRKG GRNFQAAHRR

NMLKGQHEKE AADRKRKQEE QMETEQQNKD EGKKPEVKKV EKKRETSMDS RLQRIHAEIK IBD

NMLKGQHEKE AGDRKRKQEE QMETEQQNKD EGKKPEVKKV EKKRETSMDS RLQRIHAEIK

NSLKIDNLDV NRCIEALDEL ASLQVTMQQA QKHTEMITTL KKIRRFKVSQ VIMEKSTMLY

NSLKIDNLDV NRCIEALDEL ASLQVTMQQA QKHTEMITTL KKIRRFKVSQ VIMEKSTMLY

NKFKNMFLVG EGDSVITQVL NKSLAEQRQH EEANKTKDQG KKGPNKKLEK EQTGSKTLNG

NKFKNMFLVG EGDSVITQVL NKSLAEQRQH EEANKTKDQG KKGPNKKLEK EPTGTKSLNG

GSDAQDGNQP QHNGESNEDS KDNHEASTKK KPSSEERETE ISLKDSTLDN

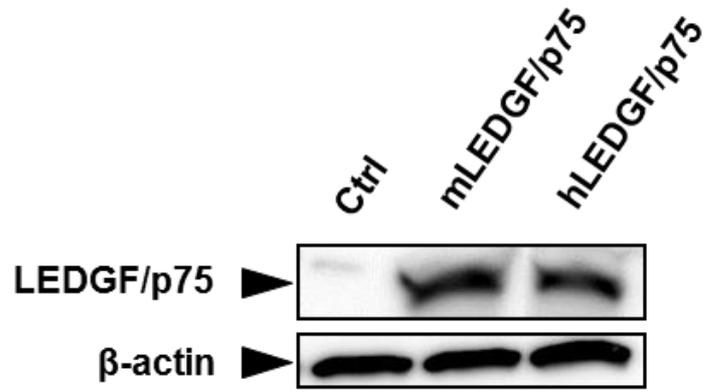
GSDAQESNHP QHNGDSNEDG KDSREASSKT KPPGEERAE ISLKESTLDN

図5 LEDGFのドメイン分布とヒト、マウス間でのホモロジー比較

(A) LEDGFは選択的スプライシングによって p75 と p52 の2種類の分子に大別される。LEDGF/p52 は HIV-IN とは結合できないが、LEDGF/p75 は IBD (Integrase Binding Domain) を介して HIV-IN と結合することができる。PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro motif)、NLS (Nuclear Localization Signal)。

(B) ヒトLEDGF/p75 とマウスLEDGF/p75間のホモロジー比較。ヒト(上)とマウス(下)のLEDGF/p75をアミノ酸配列(全530アミノ酸)で比較した。ヒト、マウス間のホモロジーは92.6%一致している。特に、重要なドメインであるPWWP、AT hook、NLS、IBDのアミノ酸配列はヒトとマウス間で完全に一致している。黄領域; PWWPドメイン、赤領域; NLS、灰領域; AT hook、青領域; IBD。

(A)



(B)

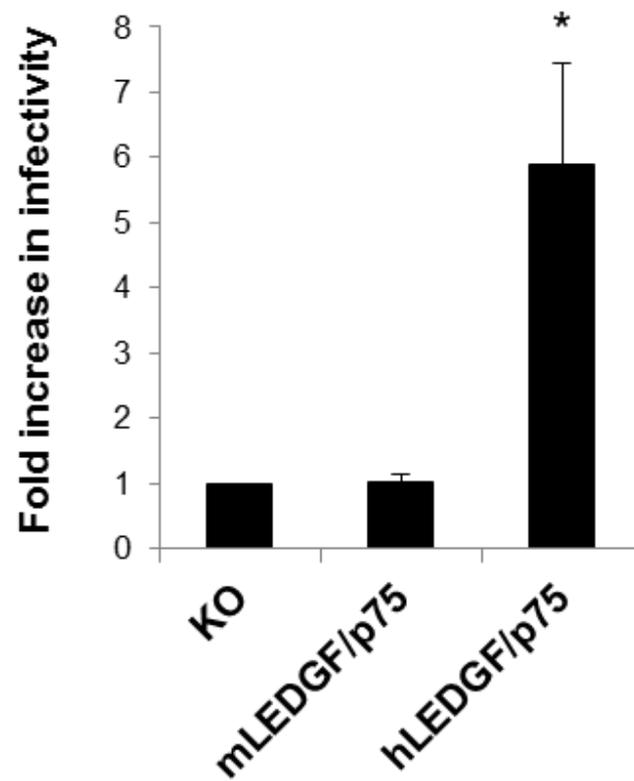


図 6 ヒト及び、マウス LEDGF/p75 の HIV-1 感染における機能差評価

(A) 293T 細胞に hLEDGF/p75 または mLEDGF/p75 発現プラスミドをトランスフェクションし、HA 抗体を使用したウェスタンブロットにより hLEDGF/p75 または mLEDGF/p75 タンパク質の発現を確認した。

(B) LEDGF/p75 KO マウスより調製した MEF は hLEDGF/p75 または mLEDGF/p75 発現プラスミド、 pCa-CD4/CXCR4 及び、phRL-TK Renilla ルシフェラーゼ発現プラスミドをコトランスフェクションした。48 時間後、細胞は 1 ng の VSV-G/HIV シュードウイルスを感染させた。感染効率は感染 48 時間後の firefly ルシフェラーゼの活性値を Renilla ルシフェラーゼの活性値で割ることで評価を行った。各々の感染効率は *student's t-test* による検定を行った。*P < 0.01。

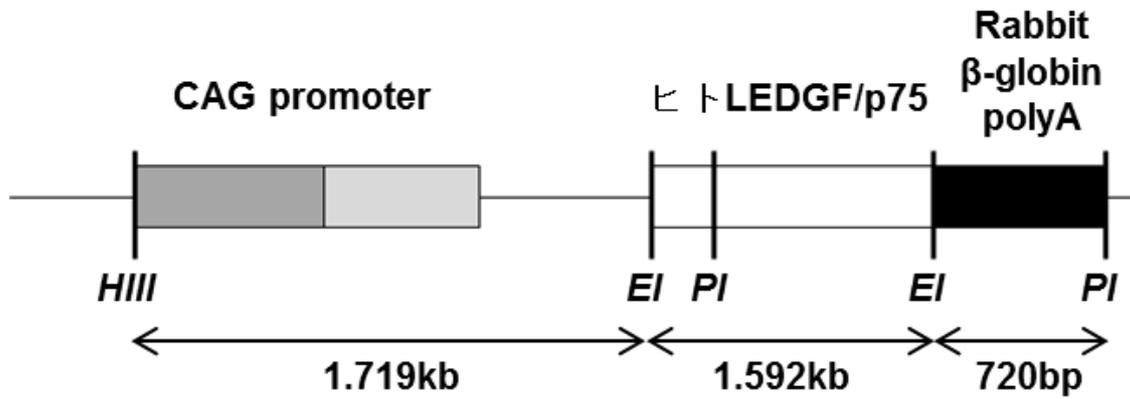
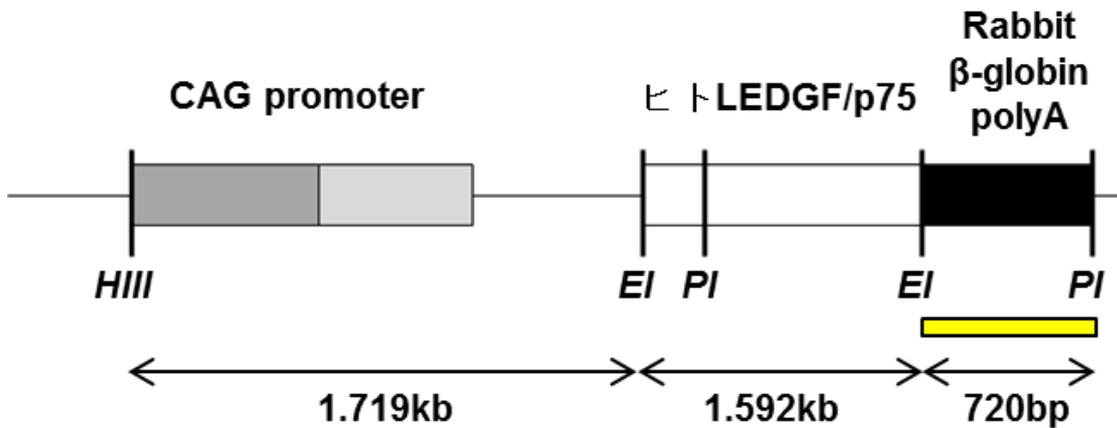


図7 ヒト LEDGF/p75 Tg 作製のためのコンストラクト

全組織非特異的にヒト LEDGF/p75 を発現させることを目的とするため、CAG プロモーター (CMV-IE エンハンサー/ Chicken β-actin) 下でヒト LEDGF/p75 遺伝子を制御するようコンストラクトを作製した。HIII; HindIII サイト、EI; EcoRI サイト、PI; PstI サイト。

(A)



(B)

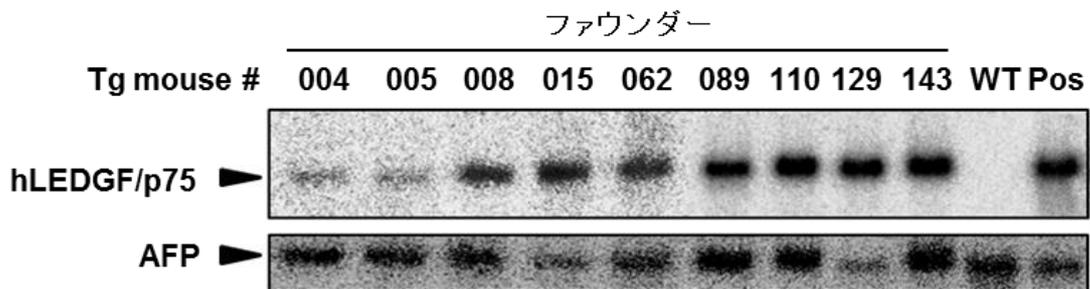


図 8 ファウンダーマウスの解析

(A) マイクロインジェクション後、誕生した仔マウスにヒト LEDGF/p75 が挿入されているか否か確認するため、サザンブロッティングによる判別を行った。ヒト LEDGF/p75 を検出するためのプローブ (β -globin probe) の位置を黄領域で示す。

(B) 仔マウス 165 匹についてヒト LEDGF/p75 の導入の有無を検討した。165 匹のうちヒト LEDGF/p75 が検出された 9 系統と WT のサザンブロッティングの

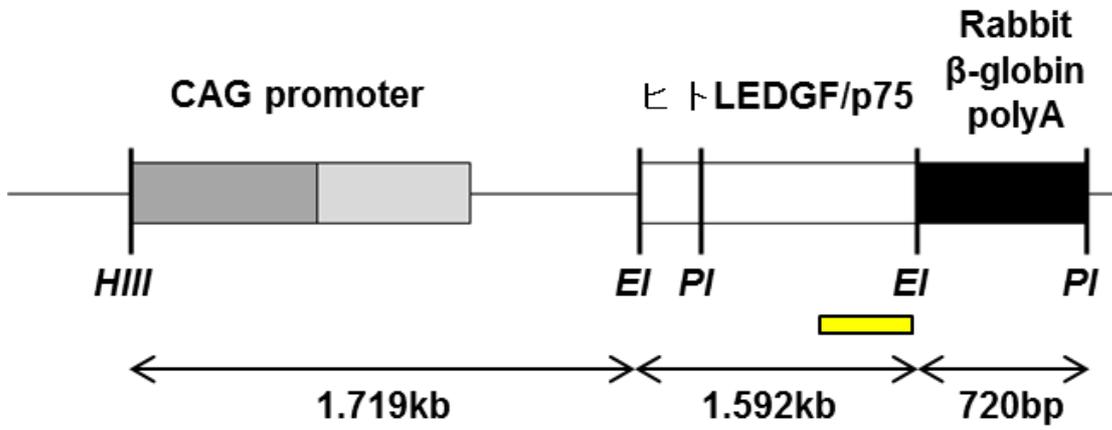
結果を示す。解析には尾ライセートから抽出した DNA を *Pst*I 処理し、10 μ g を電気泳動した。Pos; ポジティブコントロールとして WT DNA 10 μ g に 1 コピーの pCAGGS-ヒト LEDGF/p75 を加えたものを使用した。矢印はそれぞれヒト LEDGF/p75 の位置、または内在性コントロールとして用いた AFP の位置を示す。

	マイクロイン ジェクション	移植	誕生仔	離乳仔	Tg
計	3030	2631	188	165	9

表1 マイクロインジェクションの成績

3030 個の受精卵 (C3H/HeN) に hLEDGF/p75 遺伝子のマイクロインジェクションを行い、2631 個の正常卵を仮親 (ICR) に移植できた。仔マウスは 188 匹誕生し、3 週間後、165 匹を離乳した。サザンブロットィング、PCR 法により、計 9 系統のマウスにヒト LEDGF/p75 遺伝子の導入が確認できた。

(A)



(B)

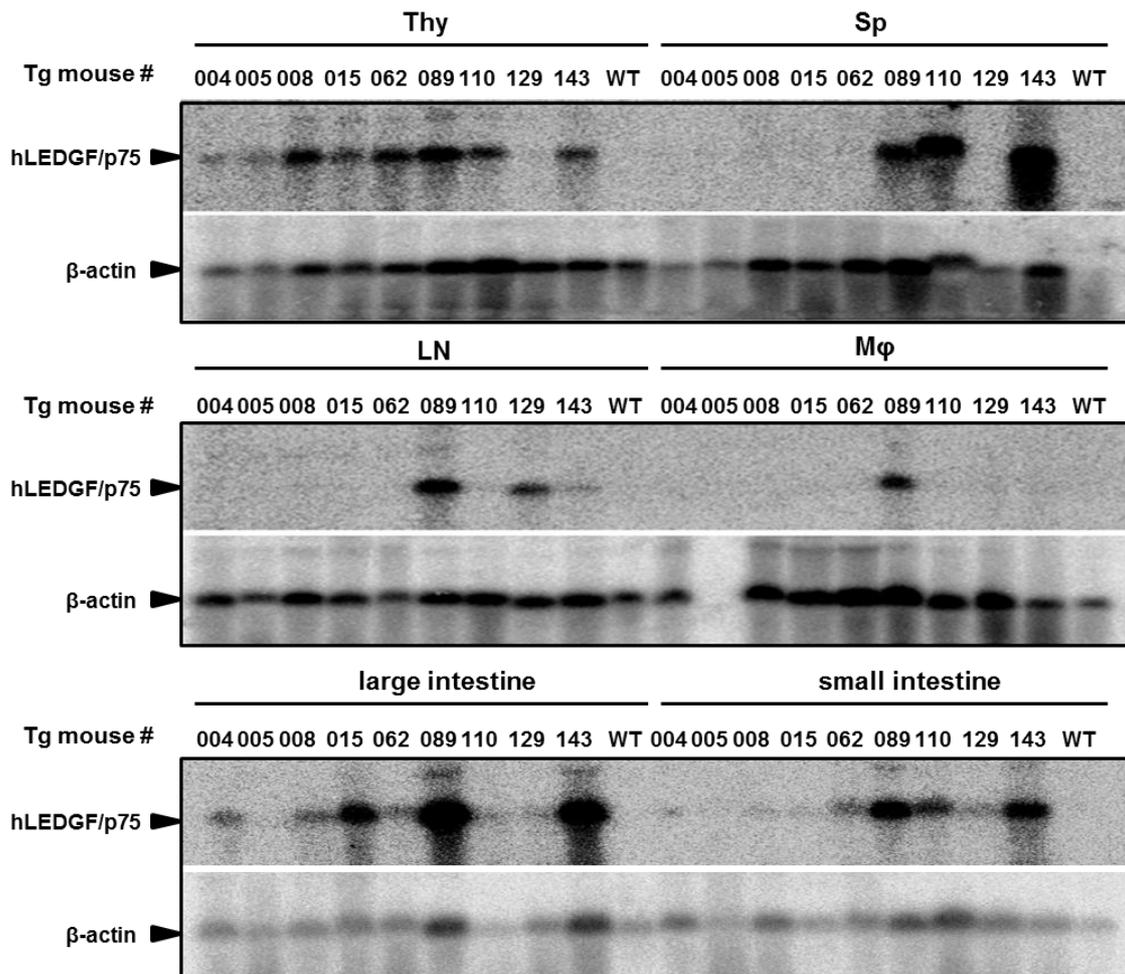
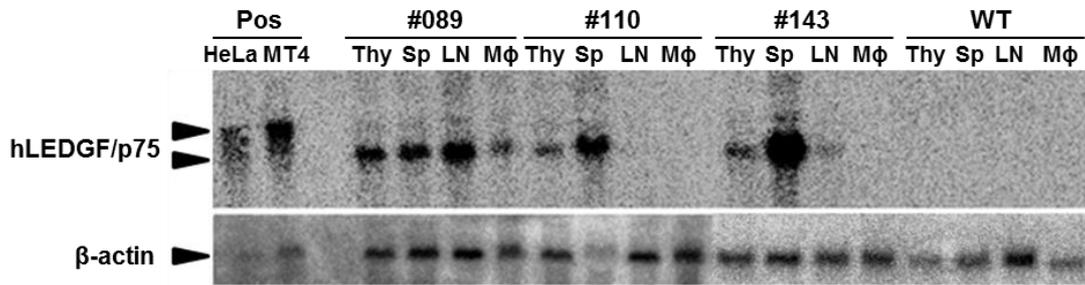


図9 Tgにおけるヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量比較

(A) 仔マウス (F1) においてヒト LEDGF/p75 mRNA が発現している確認するため、ノザンブロットィングを行った。ヒト LEDGF/p75 mRNA を検出するためのプローブの位置を黄領域で示す。

(B) 胸腺 (Thy)、脾臓 (Sp)、リンパ節 (LN)、TGC 誘導マクロファージ (Mφ)、大腸 (large intestine)、小腸 (small intestine) から採取した RNA におけるヒト LEDGF/p75 mRNA の発現をノザンブロットにより解析した。No.004~143 はそれぞれの系統を示す。矢印はそれぞれヒト LEDGF/p75 の位置、または内在性コントロールとして用いた β -actin の位置を示す。

(A)



(B)

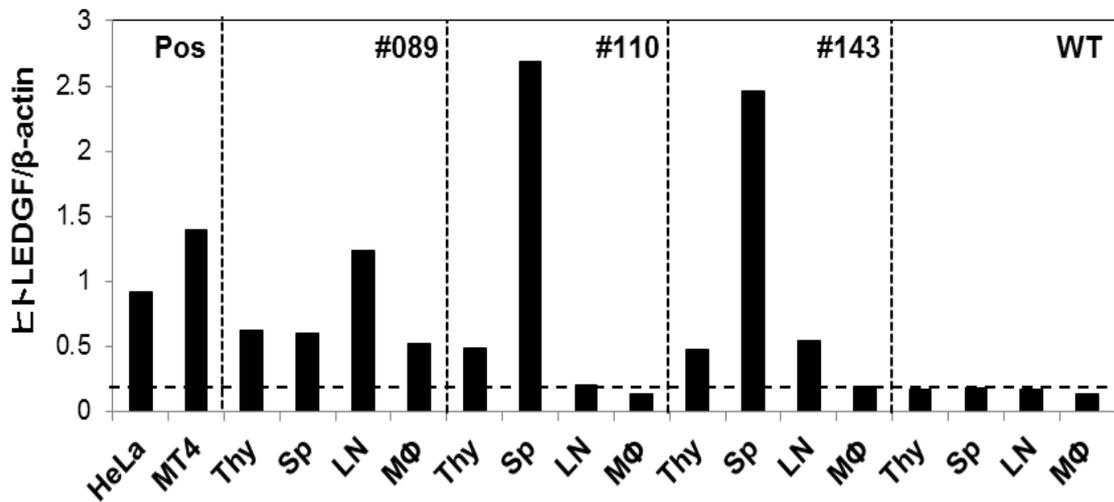


図 10 Tg におけるヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量比較

(A) Tg の系統を 3 系統 (No.089、110、143) に選別した。各々、胸腺 (Thy)、脾臓 (Sp)、リンパ節 (LN)、TGC 誘導マクロファージ (Mφ)、におけるヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量をノザンブロットティングにより解析した。ポジティブコントロール (Pos) として HeLa 細胞、MT4 細胞から採取した RNA を各 10 μg 使用した。矢印はそれぞれ、ヒト LEDGF/p75、β-actin の大きさを示す。β-actin は内在性コントロールとして使用した。

(B) ヒト LEDGF/p75 mRNA のバンドの濃度を β -actin のバンドの濃度で補正した。ネガティブコントロールである WT でのヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量は斜線で示す。

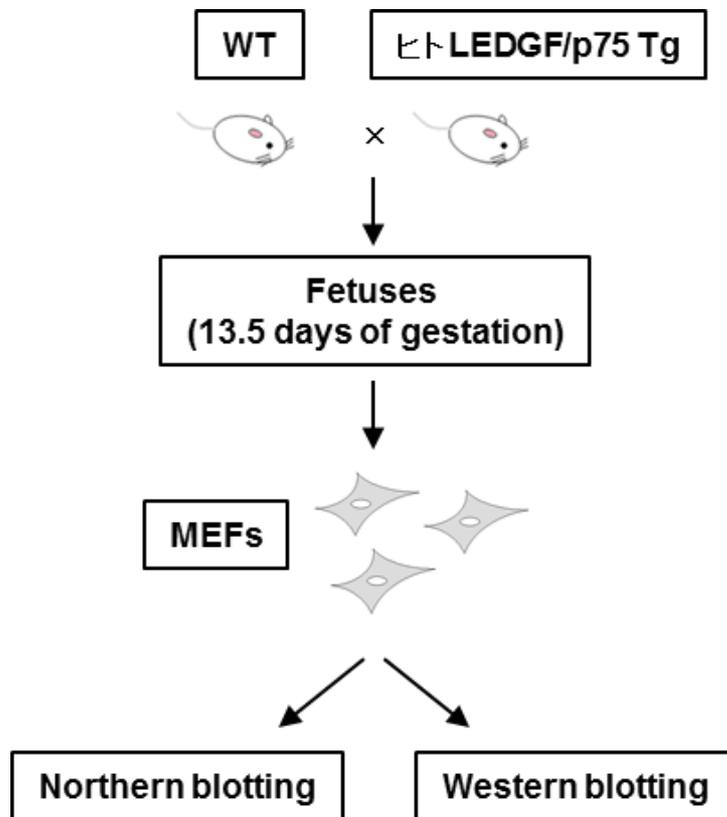
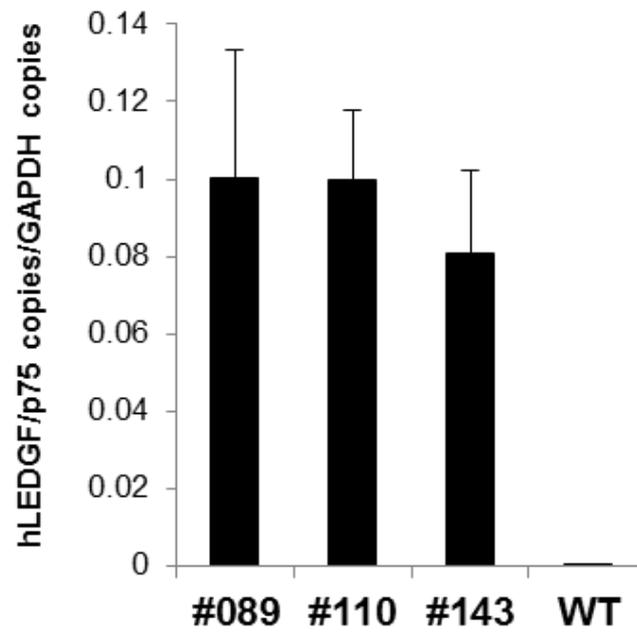


図 11 MEF の作製方法及び、ヒト LEDGF/p75 の発現解析方法

妊娠 13.5 日目の胎児より MEF を作製した。作製した MEF におけるヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量はノザンブロットティングにより解析した。ヒト LEDGF/p75 タンパク質の発現量はウェスタンブロットティングにより解析した。

(A)



(B)

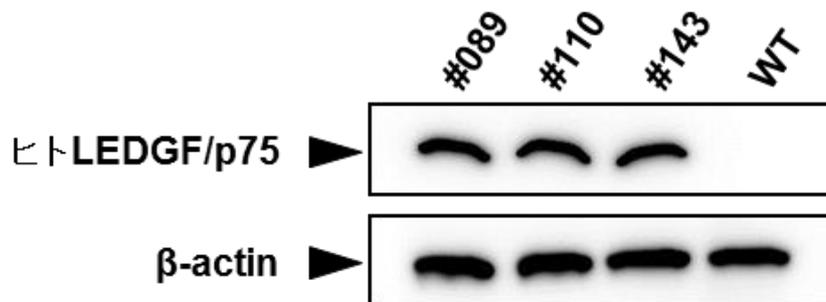


図 12 Tg MEF でのヒト LEDGF/p75 の発現解析

(A) 3系統の Tg (No.089, 110, 143) から MEF を作製し、リアルタイム RT-PCR により、ヒト LEDGF/p75 mRNA の発現を解析した。ヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量は GAPDH の発現量で割ることで定量を行った。

(B) 3系統の Tg MEF (No.089、110、143) におけるヒト LEDGF/p75 mRNA の発現量をウェスタンブロッティングにより解析した。β-actin は内在性コントロールとして使用した。

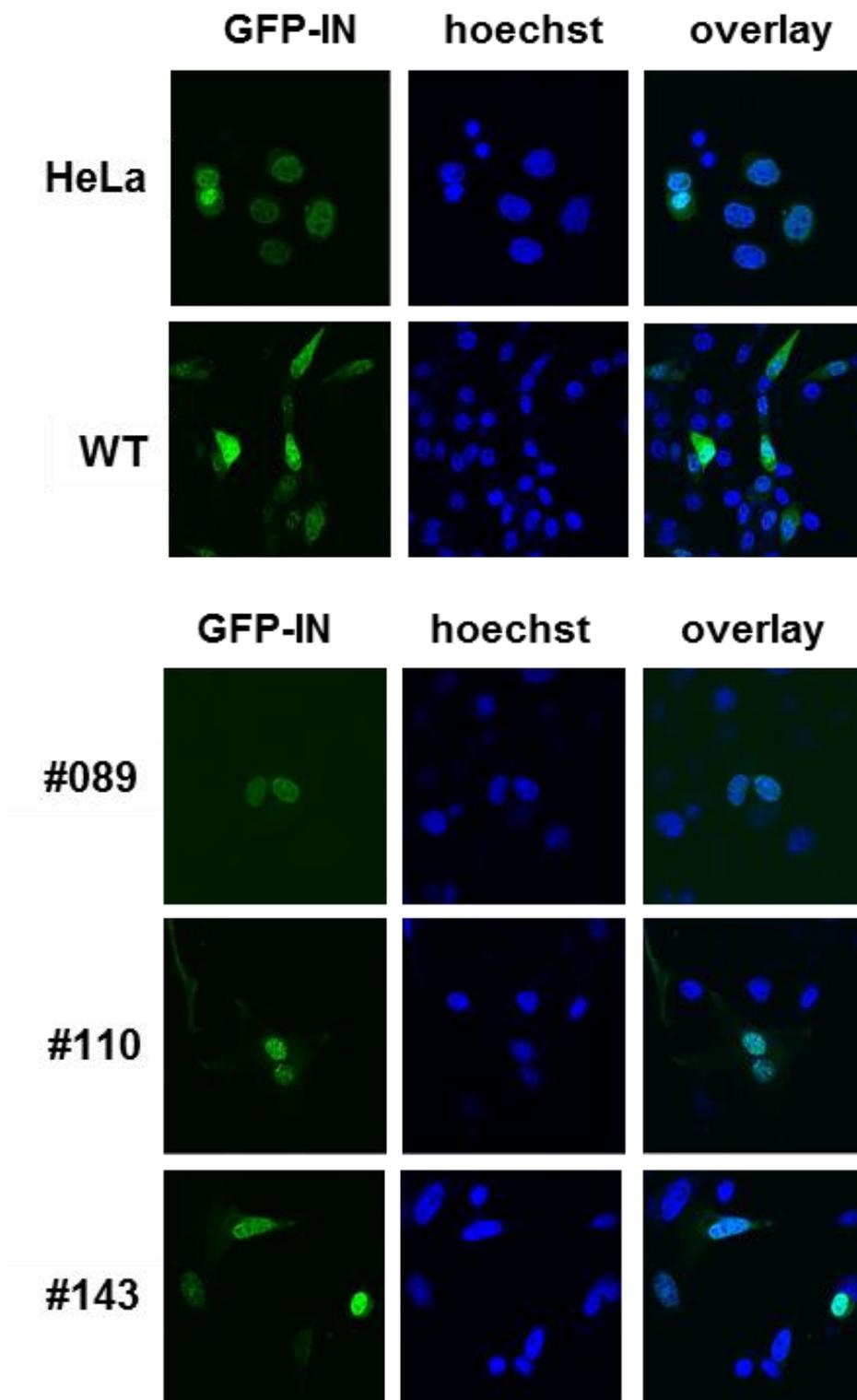
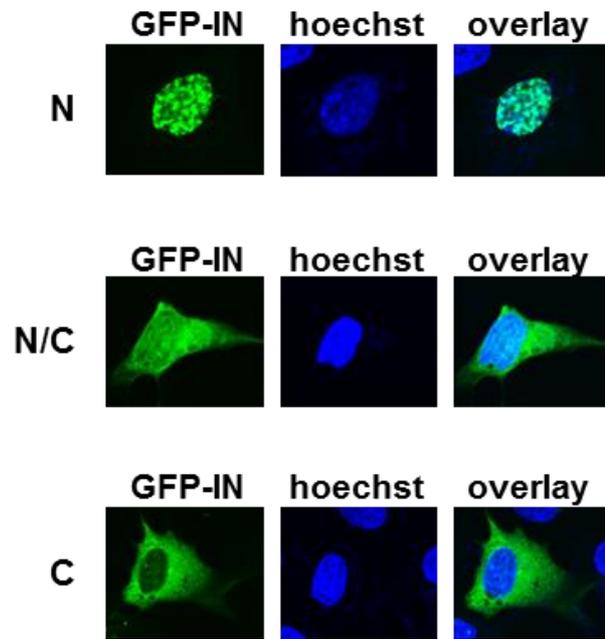


図 13 HeLa 細胞及び、MEF における GFP-IN の細胞内局在

Lipofectamine 2000 を使用して MEF に GFP-IN をトランスフェクションした。
HeLa 細胞、WT 及び、Tg MEF (No.089、110、143) における GFP-IN の細胞内
局在を一部示す。緑; GFP-IN、青; hoechst。

(A)



(B)

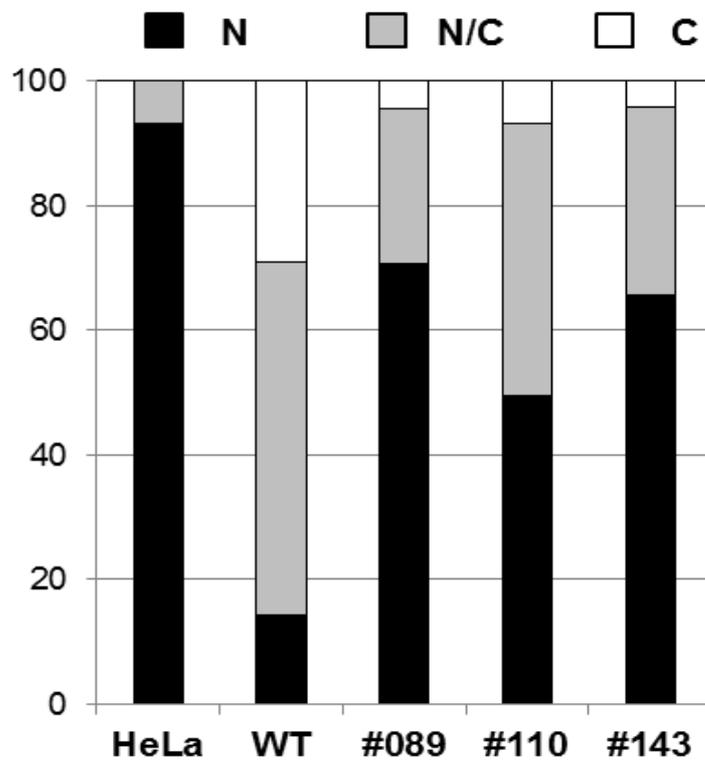


図 14 各細胞における GFP-IN 細胞内局在の割合

(A) GFP-IN の局在を見たときの指標を示す。各々 GFP の蛍光強度で分類した。N; 核>細胞質、N/C; 核=細胞質、C; 核<細胞質。

(B) HeLa 細胞、WT、Tg MEF (No.089、110、143) における GFP-IN の細胞内局在の割合を示す。HeLa 細胞については 200 個を目安に、WT 及び、Tg MEF (No.089、110、143) については各 100 個を目安にそれぞれの GFP-IN の細胞内局在数を数えた。

	N; 核>細胞質 細胞数 (%)	N/C; 核=細胞質 細胞数 (%)	C; 核<細胞質 細胞数 (%)	合計 細胞数
WT MEF	20 (14.2%)	80 (56.7%)	41 (29.1%)	141
No.089 Tg	80 (70.8%)	28 (24.8%)	5 (4.4%)	113
No.110 Tg	50 (49.5%)	44 (43.9%)	7 (6.9%)	101
No.143 Tg	67 (65.7%)	31 (30.3%)	4 (4%)	102
HeLa	189 (93.1%)	14 (6.9%)	0 (0%)	203

表 2 各細胞における GFP-IN 細胞内局在の割合

HeLa 細胞、WT、Tg MEF (No.089、110、143) における GFP-IN の細胞内局在を検討した際の細胞数を示す。表内の数字は細胞数 (割合) を示す。

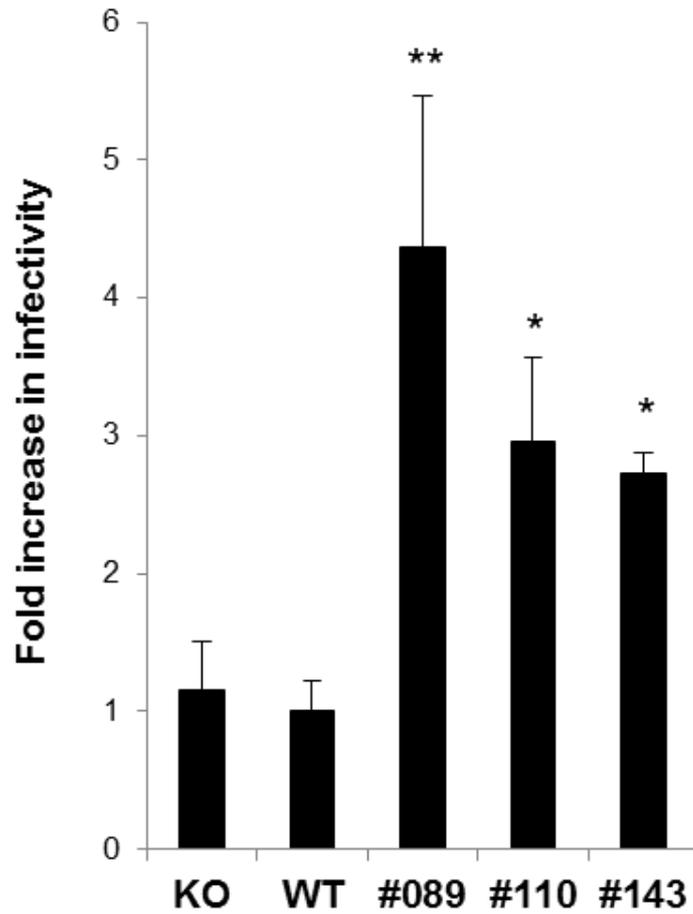


図 15 各細胞における GFP-IN 細胞内局在の割合

Tg MEF における HIV-1 感染効率を VSV-G シュードウイルスを使用して評価した。コントロールとして LEDGF/p75 KO 及び、WT MEF を使用した。VSV-G シュードウイルス感染 48 時間後の感染効率をルシフェラーゼアッセイにより評価した。各々の感染効率は *student's t-test* による検定を行った。*P < 0.05、**P < 0.01。

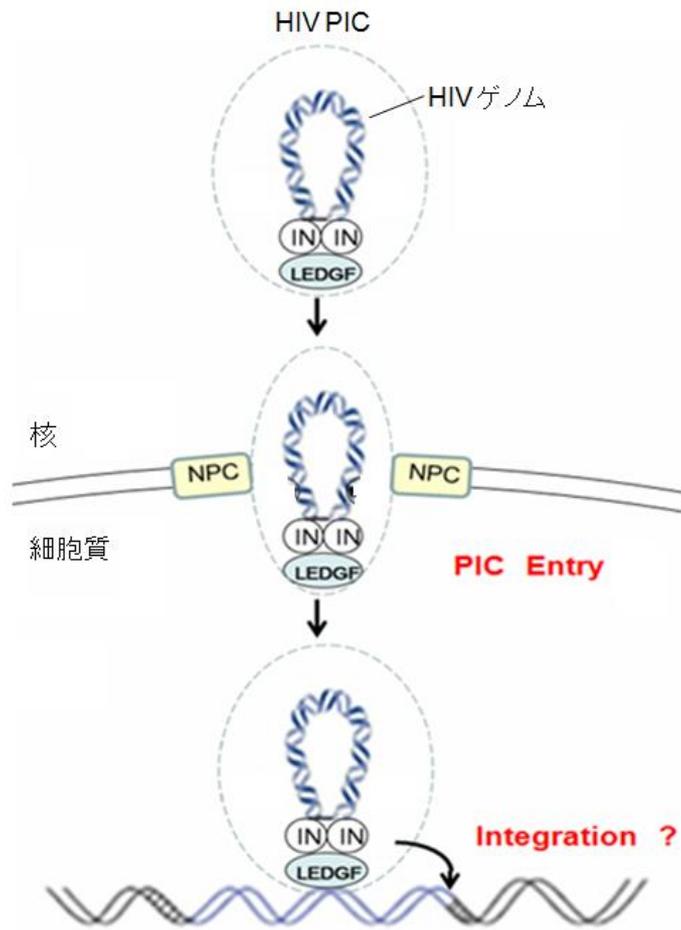


図 16 LEDGF/p75 の機能

LEDGF/p75 は HIV-IN の核移行における種間障壁となる宿主因子である可能性が示唆された。NPC; nuclear pore complex。

参考文献

- An, D.S., Poon, B., Ho Tsong Fang, R., Weijer, K., Blom, B., Spits, H., Chen, I.S., and Uittenbogaart, C.H. (2007). Use of a novel chimeric mouse model with a functionally active human immune system to study human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Vaccine Immunol* 14, 391-396. doi: 10.1128/CVI.00403-06.
- Baenziger, S., Tussiwand, R., Schlaepfer, E., Mazzucchelli, L., Heikenwalder, M., Kurrer, M.O., Behnke, S., Frey, J., Oxenius, A., Joller, H., Aguzzi, A., Manz, M.G., and Speck, R.F. (2006). Disseminated and sustained HIV infection in CD34+ cord blood cell-transplanted Rag2^{-/-}-gamma c^{-/-} mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 15951-15956. doi: 10.1073/pnas.0604493103.
- Berson, J.F., Long, D., Doranz, B.J., Rucker, J., Jirik, F.R., and Doms, R.W. (1996). A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *Journal of virology* 70, 6288-6295.
- Brass, A.L., Dykxhoorn, D.M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R.J., Lieberman, J., and Elledge, S.J. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319, 921-926. doi: 10.1126/science.1152725.
- Bukrinsky, M. (2004). A hard way to the nucleus. *Molecular medicine* 10, 1-5.
- Cherepanov, P., Devroe, E., Silver, P.A., and Engelman, A. (2004). Identification of an evolutionarily conserved domain in human lens epithelium-derived growth factor/transcriptional co-activator p75 (LEDGF/p75) that binds HIV-1 integrase. *The Journal of biological chemistry* 279, 48883-48892. doi:

10.1074/jbc.M406307200.

- Cherepanov, P., Maertens, G., Proost, P., Devreese, B., Van Beeumen, J., Engelborghs, Y., De Clercq, E., and Debyser, Z. (2003). HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 372-381. doi: 10.1074/jbc.M209278200.
- Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nature medicine* 11, 1287-1289. doi: 10.1038/nm1329.
- Denton, P.W., Estes, J.D., Sun, Z., Othieno, F.A., Wei, B.L., Wege, A.K., Powell, D.A., Payne, D., Haase, A.T., and Garcia, J.V. (2008). Antiretroviral pre-exposure prophylaxis prevents vaginal transmission of HIV-1 in humanized BLT mice. *PLoS Med* 5, e16. doi: 10.1371/journal.pmed.0050016.
- Dragic, T., Charneau, P., Clavel, F., and Alizon, M. (1992). Complementation of murine cells for human immunodeficiency virus envelope/CD4-mediated fusion in human/murine heterokaryons. *Journal of virology* 66, 4794-4802.
- Emiliani, S., Mousnier, A., Busschots, K., Maroun, M., Van Maele, B., Tempe, D., Vandekerckhove, L., Moisant, F., Ben-Slama, L., Witvrouw, M., Christ, F., Rain, J.C., Dargemont, C., Debyser, Z., and Benarous, R. (2005). Integrase mutants defective for interaction with LEDGF/p75 are impaired in chromosome tethering and HIV-1 replication. *The Journal of biological chemistry* 280, 25517-25523. doi: 10.1074/jbc.M501378200.
- Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.
- Fouchier, R.A., Meyer, B.E., Simon, J.H., Fischer, U., and Malim, M.H. (1997). HIV-1 infection of non-dividing cells: evidence that the amino-terminal basic region of

the viral matrix protein is important for Gag processing but not for post-entry nuclear import. *The EMBO journal* 16, 4531-4539. doi:

10.1093/emboj/16.15.4531.

Fujinaga, K., Taube, R., Wimmer, J., Cujec, T.P., and Peterlin, B.M. (1999). Interactions between human cyclin T, Tat, and the transactivation response element (TAR) are disrupted by a cysteine to tyrosine substitution found in mouse cyclin T.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 1285-1290.

Ge, H., Si, Y., and Roeder, R.G. (1998a). Isolation of cDNAs encoding novel transcription coactivators p52 and p75 reveals an alternate regulatory mechanism of transcriptional activation. *The EMBO journal* 17, 6723-6729. doi:

10.1093/emboj/17.22.6723.

Ge, H., Si, Y., and Wolffe, A.P. (1998b). A novel transcriptional coactivator, p52, functionally interacts with the essential splicing factor ASF/SF2. *Mol Cell* 2, 751-759.

Iwabu, Y., Fujita, H., Kinomoto, M., Kaneko, K., Ishizaka, Y., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. (2009). HIV-1 accessory protein Vpu internalizes cell-surface BST-2/tetherin through transmembrane interactions leading to lysosomes. *The Journal of biological chemistry* 284, 35060-35072. doi:

10.1074/jbc.M109.058305.

Iwakura, Y., Shioda, T., Tosu, M., Yoshida, E., Hayashi, M., Nagata, T., and Shibuta, H. (1992). The induction of cataracts by HIV-1 in transgenic mice. *AIDS* 6, 1069-1075.

Joag, S.V., Liu, Z.Q., Stephens, E.B., Smith, M.S., Kumar, A., Li, Z., Wang, C., Sheffer, D., Jia, F., Foresman, L., Adany, I., Lifson, J., McClure, H.M., and Narayan, O. (1998). Oral immunization of macaques with attenuated vaccine virus induces

- protection against vaginally transmitted AIDS. *J Virol* 72, 9069-9078.
- Konig, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T.L., Bonamy, G.M., Ireland, J.T., Chiang, C.Y., Tu, B.P., De Jesus, P.D., Lilley, C.E., Seidel, S., Opaluch, A.M., Caldwell, J.S., Weitzman, M.D., Kuhlen, K.L., Bandyopadhyay, S., Ideker, T., Orth, A.P., Miraglia, L.J., Bushman, F.D., Young, J.A., and Chanda, S.K. (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135, 49-60. doi: 10.1016/j.cell.2008.07.032.
- Li, J., Lord, C.I., Haseltine, W., Letvin, N.L., and Sodroski, J. (1992). Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5, 639-646.
- Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M., and Poeschla, E.M. (2004a). Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *The Journal of biological chemistry* 279, 55570-55577. doi: 10.1074/jbc.M408508200.
- Llano, M., Saenz, D.T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W.H., Teo, W., and Poeschla, E.M. (2006). An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science* 314, 461-464. doi: 10.1126/science.1132319.
- Llano, M., Vanegas, M., Fregoso, O., Saenz, D., Chung, S., Peretz, M., and Poeschla, E.M. (2004b). LEDGF/p75 determines cellular trafficking of diverse lentiviral but not murine oncoretroviral integrase proteins and is a component of functional lentiviral preintegration complexes. *Journal of virology* 78, 9524-9537. doi: 10.1128/JVI.78.17.9524-9537.2004.
- Lores, P., Boucher, V., Mackay, C., Pla, M., Von Boehmer, H., Jami, J., Barre-Sinoussi, F., and Weill, J.C. (1992). Expression of human CD4 in transgenic mice does not confer sensitivity to human immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 2063-2071.

- Maddon, P.J., Littman, D.R., Godfrey, M., Maddon, D.E., Chess, L., and Axel, R. (1985). The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell* 42, 93-104.
- Maertens, G., Cherepanov, P., Pluymers, W., Busschots, K., De Clercq, E., Debyser, Z., and Engelborghs, Y. (2003). LEDGF/p75 is essential for nuclear and chromosomal targeting of HIV-1 integrase in human cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 33528-33539. doi: 10.1074/jbc.M303594200.
- Mariani, R., Rasala, B.A., Rutter, G., Wiegers, K., Brandt, S.M., Krausslich, H.G., and Landau, N.R. (2001). Mouse-human heterokaryons support efficient human immunodeficiency virus type 1 assembly. *Journal of virology* 75, 3141-3151. doi: 10.1128/JVI.75.7.3141-3151.2001.
- Mariani, R., Rutter, G., Harris, M.E., Hope, T.J., Krausslich, H.G., and Landau, N.R. (2000). A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells. *Journal of virology* 74, 3859-3870.
- Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108, 193-199.
- Saijo, S., Fujikado, N., Furuta, T., Chung, S.H., Kotaki, H., Seki, K., Sudo, K., Akira, S., Adachi, Y., Ohno, N., Kinjo, T., Nakamura, K., Kawakami, K., and Iwakura, Y. (2007). Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* 8, 39-46. doi: 10.1038/ni1425.
- Shun, M.C., Raghavendra, N.K., Vandegraaff, N., Daigle, J.E., Hughes, S., Kellam, P., Cherepanov, P., and Engelman, A. (2007). LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes & development* 21, 1767-1778. doi: 10.1101/gad.1565107.

- Singh, D.P., Ohguro, N., Chylack, L.T., Jr., and Shinohara, T. (1999). Lens epithelium-derived growth factor: increased resistance to thermal and oxidative stresses. *Investigative ophthalmology & visual science* 40, 1444-1451.
- Tokunaga, K., Greenberg, M.L., Morse, M.A., Cumming, R.I., Lyerly, H.K., and Cullen, B.R. (2001). Molecular basis for cell tropism of CXCR4-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Journal of virology* 75, 6776-6785. doi: 10.1128/JVI.75.15.6776-6785.2001.
- Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli, L., Bronz, L., Piffaretti, J.C., Lanzavecchia, A., and Manz, M.G. (2004). Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304, 104-107. doi: 10.1126/science.1093933.
- Tsurutani, N., Yasuda, J., Yamamoto, N., Choi, B.I., Kadoki, M., and Iwakura, Y. (2007). Nuclear import of the preintegration complex is blocked upon infection by human immunodeficiency virus type 1 in mouse cells. *Journal of virology* 81, 677-688. doi: 10.1128/JVI.00870-06.
- Van Maanen, M., and Sutton, R.E. (2003). Rodent models for HIV-1 infection and disease. *Curr HIV Res* 1, 121-130.
- Van Maele, B., Busschots, K., Vandekerckhove, L., Christ, F., and Debyser, Z. (2006). Cellular co-factors of HIV-1 integration. *Trends Biochem Sci* 31, 98-105. doi: 10.1016/j.tibs.2005.12.002.
- Vanegas, M., Llano, M., Delgado, S., Thompson, D., Peretz, M., and Poeschla, E. (2005). Identification of the LEDGF/p75 HIV-1 integrase-interaction domain and NLS reveals NLS-independent chromatin tethering. *Journal of cell science* 118, 1733-1743. doi: 10.1242/jcs.02299.
- Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., and Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates

its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 92, 451-462.

Yu, X., Yu, Y., Liu, B., Luo, K., Kong, W., Mao, P., and Yu, X.F. (2003). Induction of APOBEC3G ubiquitination and degradation by an HIV-1 Vif-Cul5-SCF complex. *Science* 302, 1056-1060. doi: 10.1126/science.1089591.

Zhou, H., Xu, M., Huang, Q., Gates, A.T., Zhang, X.D., Castle, J.C., Stec, E., Ferrer, M., Strulovici, B., Hazuda, D.J., and Espeseth, A.S. (2008). Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4, 495-504. doi: 10.1016/j.chom.2008.10.004.

謝辞

本研究を行うにあたり、温かいご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の東京大学名誉教授、東京理科大学生命医科学研究所教授、岩倉洋一郎博士に深く感謝致します。

さらに、本研究を行うにあたり、温かいご指導、ご鞭撻を賜りました、国立感染症研究所、徳永研三博士に深く感謝致します。

また、トランスジェニックマウス作製に関して終始有益な御指導を賜りました東京大学医科学研究所 分子病態研究分野、劉陽氏、久保幸子氏に深く感謝致します。

最後に、筆者を温かく迎えて頂き、種々の御支援ならびに御助言を下された東京大学医科学研究所分子病態研究分野の皆様、東京理科大学生命医科学研究所の皆様、国立感染症研究所感染病理部の皆様に深く感謝致します。