エイズウイルスの感染機構

服部俊夫*¹, 小糸 厚*¹
村上利夫*¹, 松下修三*¹
前田洋助*¹, 高月 清*¹
加藤昌功*²

エイズが '81 年に新しい疾患として登場し, その原因ウイルス (HIV) が明らかにされたのは '83 年から '84 年である. その後, 疫学, 免疫学, ウイルス学, 遺伝学的見知から膨大な情報が集積された. しかし発症から感染に至る機構には未知な部分が多い. ここではエイズの臨床を総説的に概説した. さらに筆者の研究室で行なっている, 特に HIV が T 細胞に結合した後, 感染に至る過程で, 細胞側のプロテアーゼが関与する可能性を提唱する.

1989 年 1 月 6 日の時点で, わが国の エイズ患者は 97 人であり, 感染ルートによる内訳は男子同性愛 28 名, 異性間性交渉 12 名, 血液凝固製剤使用者 (血友病患者) 53 名, 原因不明 4 名で, 男子 88 名, 女子 9 名である. 一方, WHO の報告では '88 年現在, 世界の患者数は 13 万人を超えているので, エイズの原因ウイルスである Human Immunodeficiency Virus (HIV) のわが国における 侵淫度はかなり低いことが予測される. 世界レベルでのエイズ患者数およびエイズ研究の最先端の知識は, 最近 *Scientific American* (日本語版 12 月号, 英語版 10 月号 '88) に特集が掲載されたので参照されたい.

ウイルス感染者の臨床

エイズの原因ウイルスである HIV は ATL (成人 T 細胞白血病) の原因ウイルス (HTLV-1) と同じくレトロウイルスで T4 細胞に感染するが, HTLV-1 がオンコウイルスに属するのに対し, HIV はレンチウイルスに属する. 前者は感染細胞を腫瘍化させ, 後者は感染細胞の機能失調あるいは死滅をもたらすが, 感染個体の発症機構は一般にスローウイルス感染症と呼ばれ, 不明な点が多い. HIV の主たる標的細胞は T4 リンパ球と単球で, 細胞側の受容体は細胞膜上の T4 分子である. その他, 脳のグリア細胞, 各種臓器の

マクロファージ, 皮膚のランゲルハンス細胞, 消化管の色素親和性細胞も標的細胞となり, 病態に影響を及ぼす.

HIV はレトロウイルスであるので遺伝子は RNA である. その感染に際しては, RNA を DNA に転写させる逆転写酵素を使用し, いったん感染が成立すると感染個体は終生キャリアーとなり感染源となる. HIV 感染により一部の患者では感染後 2~9 週後に伝染性単核球症様の急性症状を呈する. その際, HIV 抗原が血中に検出される. その後, 抗 HIV 抗体が産生され, HIV 抗原は消失する. さらに 8~9 年にわたるリンパ節腫大, および AIDS Related Complex (ARC) の時期を経てエイズを発症する.

感染者のうち, 5 年以内にエイズを発症する率は 10~30% といわれているが, 発症率は感染ウイルスの種類, 個体の生活様式, 年齢などの個体の発症補助因子により規定される. いったんエイズを発症すると, 死亡率は診断後 36 カ月以内に 80% と非常に高い. 発症は皮膚や粘膜の慢性感染症で始まり, 汎発性の感染症となる. 強い免疫不全状態があるので, カボシ肉腫, 悪性リンパ腫などの悪性腫瘍およびカリニ肺炎, 口腔カンジダ症, 全身のサイトメガロウイルス感染症, 結核など多彩な日和見感染症を生ずる. また性格変化, 異常行動, 痴呆などの多様な精神状態を呈する.

エイズの発症予測は難しいが, T4 細胞の絶対数が $400/\text{mm}^3$ 以下, あるいはツベルクリン反応などの皮膚遅延性過敏反応が消失してきたら注意を要する. また血清中の抗 HIV 抗体, 特に抗

Mechanisms of HIV Infection

*¹ Toshio HATTORI, Atsushi KOITO, Toshio MURAKAMI, Shuzo MATSUSHITA, Yosuke MAEDA, Kiyoshi TAKATSUKI, 熊本大学医学部, *² Masayuki KATO, バイエル薬品研究開発部門

P24 抗体が減少し HIV 抗原が再出現すると、体内でのウイルス産生が高まっているか、あるいは免疫不全が進行している兆候なので注意を要する。病期の判定は CDC 分類 (表 1) が代表的であるが、Walter Reed 方式による分類は実用的である (表 2)。

剖検により典型的なエイズ患者のリンパ節を検索すると、リンパ球はほとんど認められず、リンパ球は消失し組織球の増生と繊維化が見られ、リンパ節構造がほぼ完全に破壊されている。HIV はリンパ球にはほとんど認められず、一部の Follicular Dendritic Cell に認められる。しかし、病期全体を通じて感染個体から HIV 感染細胞を検出することは難しい。

治療法としては、上述のようにリンパ節が崩壊した状態なので、その再構築は現在の医学では難しく困難を極め、次々に生ずる日和見感染症、悪性腫瘍への対症療法が主となる⁽¹⁾。種々の抗ウイルス剤が開発されているが、疾患の発症機構を解明し、発症予防的な感染初期より使用できる新しい発想に基づく薬剤の開発が望まれている。また、ワクチンの開発も HIV が変異しやすいこと、および単球に抗原抗体複合体の様式で感染が成立してしまうので期待しにくい。現実には動物実験で液性、細胞性免疫能を誘導しても、HIV をチャレンジすることごとく感染が成立してしまい、今のところ悲観的なデータしかない⁽²⁾。したがって、臨床の場での HIV 感染に最も有効な方法は高リスクグループへの教育を中心にした感染阻止である。

HIV の構造

HIV の構造を シェーマで表わすと図 1 のようになる。RNA 遺伝子は gag 蛋白、p 24 で保護

表 1 ■ HIV 感染の病型分類の概略 (CDC, 1986)

分類	病態
第 1 群	感染初期に特有な、一過性の症状がみられる抗 HIV 抗体陽性の患者
第 2 群	感染による症状はないが、抗 HIV 抗体陽性の患者
第 3 群	持続性全身性リンパ節腫脹がみられる患者 鼠径部以外に少なくとも 2 個所に 3 カ月以上持続して 1 cm 以上のリンパ節腫脹がみられる リンパ節腫脹以外の症状はみられない
第 4 群	リンパ節腫脹の有無にかかわらず、そのほかの症状が合併している患者 亜群 A 全身性の持続的症状を有する患者 (発熱、体重減少、下痢症など) 亜群 B 神経症状がみられる患者 (痴呆、ミニロパチー、末梢性ニューロパチー) 亜群 C 細胞性免疫不全が予測される感染症が HIV 感染と合併している患者 亜群 D HIV 感染が原因となる二次的な悪性腫瘍がみられる患者 亜群 E A ~ D の亜群に分類されない 4 群の患者

表 2 ■ Walter Reed (WR) の HIV 感染病型分類

分類	HIV 抗体 (HIV)	慢性リンパ節腫脹	ヘルパー T リンパ球	遅延型皮膚反応	口腔内カンジダ症	日和見感染
WR 0	—	—	>400	正常	—	—
WR 1	[+]	—	>400	正常	—	—
WR 2	[+]	[+]	>400	正常	—	—
WR 3	[+]	±	[<400]	正常	—	—
WR 4	[+]	±	[<400]	[P]	—	—
WR 5	[+]	±	<400	[C および/または +]	—	—
WR 6	[+]	±	<400	PC	±	+

[—] : 分類に不可欠な項目、P : 4 種の抗原 (タタヌス、トリコフィトン、ムンプス、カンジダ) のうち一部陽性、C : 4 種の抗原すべて陰性

図 1 ■ HIV の 模式構造図

されている。さらにウイルス粒子の脂質 2 重層の内側は p 18 で保護されている。ウイルス外膜蛋白は gp 120 で、この gp 120 が脂質 2 重層の外側に存在するにあたっては、膜貫通蛋白 gp 41 が重要な役割を果たしている。図 2 に遺伝子配列

ンブロットィング(WB)法は抗体が真にウイルス構成蛋白を認識していることを示すので有用である。図3に典型的な WB の結果を示す。患者血清が主に認識する蛋白は gag 蛋白 p 24 と p 15, 逆転写酵素由来の p 61, p 55 が観察される。gp 160 は, gp 120 と gp 41 の前駆体である。診断および臨床経過を追うのには, 抗 p 24, 抗 gp 41 抗体が有用であるとされている。

HIV 感染の成立とウイルス生活史

さて, 本稿の主題は HIV 感染機構である。現在までの知見では, HIV の細胞受容体は T 4 分子であることが知られている⁽⁴⁾。T 4 分子に結合するウイルス側蛋白は HIV の外膜蛋白 gp 120 である。結合後ウイルスは脱殻し, 細胞内に侵入し感染細胞の DNA に組み込まれ, 感染が成立する。HIV に限らずウイルスは宿主が限られており, たとえばマウスのリンパ球あるいは繊維芽細胞に T 4 分子を発現させても HIV 感染は成立しない。DNA に組み込まれた後に, HIV はマイトーゲン, あるいはヘルペスウイルス, HTLV-1 刺激によりウイルス蛋白を発現して出芽し放出される。あらゆる HIV の産生シグナルは疾患の進展を促進するものと思われ, またこのすべてのステップは抗ウイルス剤の標的となりうる。

抗原認識と感染阻止

1. T 4 分子

免疫担当細胞である T 細胞は, 抗原を特異的に認識し増殖する。抗原を認識するにあたっては, T 細胞上の T 細胞抗原受容体 (TCR) が使用される。この認識には TCR が抗原提示細胞上の抗原情報をクラス II 抗原とともに認識することにより生ずる。クラス II 抗原の認識には T 4 分子が関与する。したがって, T 4 分子は抗原提示細胞が自己であることを認識するために必要な免疫反応にとっては, きわめて重要な役割を担っている。

免疫学の進展により, T 4 分子の様々なエピトープに対する抗体がすでに作製されており, その中でも代表的な抗体は OKT 4, MT 151, Leu 3 a,

図 4 ■ T 4 分子の構造

T 4 分子の詳細な構造は不明だが, 現在わかっているところでは, 大部分が細胞外にあり, 膜通過部分と細胞内部分は短いようである。V1~V4 と名づけられたドメインは, それぞれ, 免疫グロブリン (抗体) のいわゆる可変領域とホモロジーをもつ (よく似ている)。HIV の gp 120 と結合する部位は, 最も外側にある。代表的な抗 T 4 抗体 (Leu 3 a, OKT 4, OKT 4 a, MT 151) の認識部位を示したが, このうち, Leu 3 a と OKT 4 a は HIV と同じ部分に結合するため, HIV を阻害する。

OKT 4 a などである。T 4 分子の大部分を構成する細胞外部分は 4 つのドメイン (領域) よりなり, 抗体の可変部位とよく似た免疫グロブリンのスーパーファミリーに属する。この T 4 分子に遺伝子変異を起こさせたり, あるいは抗体の結合部位のエピトープを解析することにより gp 120 との結合部位は T 4 分子の N 末端側の 100 アミノ酸からなることが明らかになった⁽⁵⁾。Leu 3 a, OKT 4 a はこのアミノ酸領域を認識し,

くいからではないかと思われる。またこの部分は糖鎖に富み、免疫系により認識しにくい構造をしている可能性もある。

gp 120 の種々の ペプチドフラグメントを家兔に免疫したり、gp 120 をマウスに免疫したりする実験により、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体が作製され、その中には感染を阻止できる抗体が存在した⁽⁸⁾。筆者らが作製したモノクローナル抗体である 0.5 β 抗体は、遊離ウイルスおよび細胞間感染を用量依存的に抑制した。一方、ペプチドを抗原にしてポリクローナル抗体を作製していた米国のグループも gp 120 のどの部分に対する抗体が感染を抑制できるのかについてある程度めどをつけていた。早速共同研究が始まり、0.5 β 抗体は彼らが予測していたペプチドに見事に反応し、中和エピトープは 24 個のアミノ酸よりなることが明らかにされエピトープ β と呼ばれた⁽⁹⁾。現在までに中和活性を誘導できる gp 120 のエピトープが報告されているが、エピトープ β は数箇所研究室で追試がなされた唯一の中和能誘導エピトープである。

gp 120 は名前に示されるように糖蛋白であり、また糖の構成部分は全蛋白の 30~40% を占める。また種々の HIV ストレインを比較すると最も変異の激しい部分であり、ワクチン作製の大きな障害となっている。遺伝子工学的手法を用いて gp 120 が作製され (r-gp 120)、この蛋白の T 4 抗原陽性細胞への結合を阻止できるモノクローナル抗体が作製された⁽⁷⁾。しかしこの抗体は gp 120 の結合を阻止はするが、感染を阻止できない。さらにこの部分は変異しやすいといわれている gp 120 の中でもよく保存されている部分である。したがって、それぞれの感染個体が種々のウイルスに感染しているとしてもこの T 4 結合部位に対する抗体ができれば、一人の感染個体の血清は種々のウイルスを中和できる。すなわち、感染個体血清は交差中和抗体活性を持つ。しかし、筆者らの検索でも、また他の研究室からの報告でも、感染個体血清はある種のウイルスストレインの感染を阻止できるが、他のウイルスストレインの感染を中和できない。これは先述のように gp 120 の T 4 結合部位が陥凹構造をしているために抗体が感染細胞膜上に届きに

1	M R V K
31	T E K L
61	Y D T E
91	E N F N
121	K L T P
151	K G E I
181	I I P I
211	E P I P
241	N*V S T
271	V I R S
301	Q I R S
331	C N* I S
361	F K Q S
391	F N* S T
421	K Q I I
451	G L L L
481	S E L Y
511	R A V G
541	A R Q L
571	W G I K
601	K L I C
631	W D R E
661	L L E D
691	G L V G
721	L P I P
751	G S L A
781	I V E L
811	A V S L
841	R H I P

図 5 ■ NBRF
下線：T 4 分子

	5	10	15	20	25	30
1	M R V K E K Y Q H L W R W G	M R V K E K Y Q H L W R W G	M R V K E K Y Q H L W R W G	M L L F G M L M I C S A		
31	T E K L W V T V Y Y G V P V W	T E K L W V T V Y Y G V P V W	T E K L W V T V Y Y G V P V W	T T L F C A S D A K A		
61	Y D T E V H N V W A T H A C V W	Y D T E V H N V W A T H A C V W	Y D T E V H N V W A T H A C V W	T P N P Q E V V L V N * V T		
91	E N F N M W K N D M V E Q M H E D	E N F N M W K N D M V E Q M H E D	E I I S L N W S S S G R M I C V			
121	K L T P L C V S L N K I C T S D L S	K L T P L C V S L N K I C T S D L S	K N * D T N T N * S S S G R M I C V			
151	K G E I K N C S F N * I T S I R G K	K G E I K N C S F N * I T S I R G K	V V I T Q A C P K V S F			
181	I I P I D N * D T T S Y T L T S C N * T	I I P I D N * D T T S Y T L T S C N * T	S V I T Q A C P K V S F			
211	E P I P I H Y C A P A G F A I L K C	E P I P I H Y C A P A G F A I L K C	N N * K T C N V N * G T G P C T			
241	N * V S T V Q C T H G I R P V V V S T	N * V S T V Q C T H G I R P V V V S T	Q L L L L N * G S L A E E E V T			
271	V I R S A N F T D N A K T I I V Q L N * Q	V I R S A N F T D N A K T I I V Q L N * Q	S V E I N * C T R P A H			
301	N * N T K S R I O G A F V T T K K K K	N * N T K S R I O G A F V T T K K K K	N N M R Q P A H			
331	C N * I S R A K W N N * I T L K Q I D	C N * I S R A K W N N * I T L K Q I D	S K L R E Q F G N N * K T I I			
361	F K Q S S G G D P E I V T H S F N C G	F K Q S S G G D P E I V T H S F N C G	G E F F Y C N * S T Q L			
391	N * S T W F N * S T W S T K G S N * N T	N * S T W F N * S T W S T K G S N * N T	T E G S D T I T L P C R I			
421	K Q I I N M W Q E V G K A M Y A P I S	K Q I I N M W Q E V G K A M Y A P I S	G Q I R C S S N * I T			
451	G L L L T R D G G N S N * E S E I F R P	G L L L T R D G G N S N * E S E I F R P	G G G D M R D N W R			
481	S E L Y I G A V V K I E P L G A V A P T	S E L Y I G A V V K I E P L G A V A P T	K A K R S V V L Q R E K			
511	R A V G I G A L V F L G A A G S T M G A	R A V G I G A L V F L G A A G S T M G A	A A S M T L T V Q			
541	A R Q L L S G I V Q Q Q N N L L R A I E	A R Q L L S G I V Q Q Q N N L L R A I E	A Q Q H L L Q L T V			
571	W G I C K T Q A R I L A V E R Y N K S E	W G I C K T Q A R I L A V E R Y N K S E	Q L L G I W M G C S G			
601	K L I C Q T T A V P W N A S W S L K S L E	K L I C Q T T A V P W N A S W S L K S L E	Q I W N N M T W M L			
631	W D R E I N N Y T S L I H S N I E E S Q	W D R E I N N Y T S L I H S N I E E S Q	Q N Q E K N Q E L G			
661	L E L D K W A S L N W F N I T N W L W Y I	L E L D K W A S L N W F N I T N W L W Y I	K F I M I V G			
691	G L V G L R I V F A V L S V V N R V R Q	G L V G L R I V F A V L S V V N R V R Q	G Y S P L S F Q T H			
721	L P I P R G P D R D P E S L E E F S Y H	L P I P R G P D R D P E S L E E F S Y H	R R D R S I R L V N			
751	G S L A L I W D D L R S L C L E F S Y H	G S L A L I W D D L R S L C L E F S Y H	R L L I V T N S			
781	I V E L L G R R G W E A L K Y W W N L	I V E L L G R R G W E A L K Y W W N L	Q L Q Y V S Q E L K N S			
811	A V S L L N A T A I A V A L E G T D	A V S L L N A T A I A V A L E G T D	R V I E V V G G A Y R A I			
841	R H I P R R I R Q G L E R I L L	R H I P R R I R Q G L E R I L L				

図 5 ■ NBRF に登録されている HTLV-IIIB の *env* 領域のアミノ酸配列
下線: T4 分子との結合部位, N*: 糖鎖結合可能部位

エピトープβについて

図5に National Biomedical Research Foundation (NBRF) に登録されている HIV の代表的ストレイン HTLV-III B env 蛋白のアミノ酸配列リストを示す。現在まで筆者らの指摘したエピトープ以外にも~~~~で示したペプチドT部分⁽¹⁰⁾, □で示したニューロロイキンと相同性がある部分も HIV 感染に関与しているとの報告がある⁽¹¹⁾。しかしこのエピトープの構造と機能についての明解な説明はないようである。筆者らの作製した感染阻止モノクローナル抗体が認識する配列を□で囲んで示した。以下、この部分配列が持つ生物学的活性について得た知見を述べる。

1. 相同性検索例

今日、ある機能的に重要と思われるアミノ酸配列を得た場合、その配列と相同な配列を持つ蛋白を見いだすためにコンピューターを利用したデータベース検索を行なうことはルーチン作業となっている。筆者らも、得たエピトープ配列を NBRF データベースに対して検索した(京大食研 岩本博行博士の協力を得た)。相同性検索についての原理的詳細およびその応用例については、特集を参照されたい⁽¹²⁾。ここでは概略を定性的に述べるに留める。

もともと相同性検索は、蛋白間の系統樹作成のために開発された方法であり、今回筆者らが使用した目的とは少しばかり異なるが、より“相同スコア”が良くなるように並置するという原理は同じである。ここでスコアであるが、これは並置した各アミノ酸が一致した場合のスコアが割り振られており、たとえばトリプシン残基などの一致はスコアが良く、また一致しなくても同義アミノ酸の並値にはスコアが与えられる。このような一致または並値の対スコアが最良になるように選ばれた配列が相同性を持つ配列として出力される。検索に当たっては、入力時に相同スコアの閾値を設定し、この値を満足させるすべての部分配列が出力される。相同閾値をあまり厳しくすると確かに相關の強い配列が出力されるが、重要な一群の蛋

エピトープβ	S	I	R	I	Q	R	G	P	-	G	R	-	A	F	V	T	I
ITI(ブタ)	S	L	P	I	V	Q	G	P	-	C	R	-	A	F	I	R	L
ITI(仔ウシ)	N	L	P	I	V	Q	G	P	-	C	R	-	A	F	I	Q	L
ITI(ウマ)	N	L	P	I	V	Q	G	P	-	C	R	-	A	F	I	R	L
ITI(ヒト)	N	L	P	V	I	R	G	P	-	C	R	-	A	F	I	Q	L
SBTI	G	I	G	T	I	I	S	P	S	Y	R	I	R	F	I	A	E

図6■エピトープβと ITI, SBTI の相同性

白を見失う恐れがあり、また逆にあまりゆるく設定すると大量の蛋白が出すぎてしまい、戦略が立たなくなる。筆者らのように使う側にとっては、データベースは入手した配列の生物活性の見当をつけるための手段であり、一群のある特定の機能を持つ蛋白が出力されたならば、その情報は研究を進めるための指針として重要なものとなる。

今回のエピトープβを用いての検索では 90 ほどの蛋白が出力されたが、特に筆者らの興味を引いたのは、プロテアーゼとともに Kunitz 型プロテアーゼインヒビター群がエピトープβと並置して出力された事実である。その中で最も相同性の高いのがインター-α-トリプシンインヒビター(ITI)であった。なお、相同性は低いものの、セリンプロテアーゼインヒビターの代表格である大豆由来のトリプシンインヒビター(SBTI)を記しておく(図6)。ITIに一番興味を持った理由は、このシステイン残基のC側の Arg 残基がこれらのインヒビターの反応部位であるという点である。この並置残基数と相同性の解釈であるが⁽¹³⁾、残基数が短いものの比較的強い類似性と解釈でき、エピトープβの2次構造予測および機能予測として活用できると考えられた。しかも、これらの並置配列は Kunitz 型セリンプロテアーゼインヒビター P4~P'2 の反応部位残基の条件を満たすと思われる、またこのインヒビター配列は HIV の変異領域に属するにもかかわらず各ストレインで保存されており、HIV 感染におけるエピトープβ部と T4 リンパ球のセリンプロテアーゼの相互作用の関与を想定できた。前述のように、筆者らのエピトープβと同等の部位が他の研究者にとっても HIV 感染に重要なエピトープとして同定され報

図 7 ■ エピトープ β の構造予測

告されている。そして現時点で、このエピトープ β 同等部の二次構造の解釈が筆者らのものと異なっており、興味深いので少し紹介したい。

Takahashi ら⁽¹⁴⁾ は、エピトープ β 同等部位がクラス I 主要組織適合拘束の T 細胞エピトープであることを H-2d マウスの系で証明したが、彼らはエピトープ β 同等部位を想定するのに amphipathic α -helix のインデックスの高い部位の予測が有益であったとしている⁽¹⁵⁾。実際、HIV gp 160 組換えワクシニアウイルスを感染させた H-2d マウスにおける細胞障害性 T リンパ球の活性は、amphipathic インデックスが最高値をとる部分配列（エピトープ β 同等部位）の合成ペプチド添加時に最大であった。amphipathic α -helix については近年その T 細胞抗原性との関連で分析が進んでおり、ワクチンデザインのための有力な情報を与えると考えられている⁽¹⁶⁾。

一方、Goudsmit らは、彼らのエピトープ β 同等部位中の Gly-Pro-Gly-Arg 配列が大きな β -turn potential を与え、この β -turn から一次構造上 N 末端および C 末端側に最も近接し、HIV の各ストレインで非常によく保存されているシステイン残基どうしのジスルフィド結合により、ループが形成されることが中和抗体との結合に重

要であろうとしている⁽¹⁷⁾。これら α -helix と β -turn という相反する仮説が提示されているのは興味深い。

筆者らがエピトープ β 部を Kunitz 型インヒビターの反応部位であると想定するからには、この部分が分子表面露出領域（高い親水性と表面存在確率）にあり、しかも比較的柔軟な構造を持たなければならないが、同一エイズ患者から経時的に分離された HIV 変異株の *env* アミノ酸配列のコンピュータによる詳細な配列分析では、これらの条件をエピトープ β 部分は満たすことが予測されている⁽¹⁸⁾。つまり、筆者らの仮説はジスルフィド結合ループの意見のほうに近いものといえる（図 7）。しかし、ここでは蛋白質全体中の部分配列と合成部分配列のコンホメーションは異なっている可能性が強いことを認識しておくのが、以下に述べる合成ペプチドを用いての論旨の展開にとって重要と思われる。

ともあれ、筆者らは、コンピュータによるデータベース検索により次の段階で行なうべきアッセイについて重要な情報を得ることができた。つまり、HIV 感染には T4 分子がリガンドで HIV の受容体であることは間違いがない、しかし HIV が T4 分子に結合した後は T4 分子を介しての internalization は不要とされている。その後、どのようなプロセスを経て HIV 感染が成立するかは、不明な点が多い。今までに示したデータからはエピトープ β が T4 リンパ球表面のある種のセリンプロテアーゼにより分解され感染が成立する可能性が濃厚と考えた。

2. エピトープ β の機能

まずエピトープ β (NNT 24) と両端のシステインを含む 36 個のアミノ酸よりなるペプチド (CTR 36) を合成し、そのトリプシン阻害活性を検討した。TPCK-トリプシンを酵素とし、基質を Boc-Phe-Ser-Arg-MCA とした場合の合成エピトープの阻害は図 8 に示すように拮抗阻害であり、 K_i 値はそれぞれ $12.5 \mu\text{M}$, $24.2 \mu\text{M}$ であった。これによりエピトープ β が Kunitz 型プロテアーゼインヒビター活性を有することが判明し

図 8 ■ 各種ペプチドによるトリプシン活性の阻害様式
a) 基質濃度への影響。●: 20 μM CTR 36, ■: 20 μM NNT 24 各存在下, Δ : ペプチド非存在下。Lineweaver-Burk plot 使用。
b), c) 基質濃度への影響 (Boc-Phe-Ser-Arg-MCA, ●: 0.025 mM, ○: 0.1 mM)。b): CTR 36, c): NNT 24。Dixon plot 使用。

た。Matsuzaki らは、最近部分構造としてアルギニン部、キノリン部、ピペリジン部を持つトロンビン特異的な合成阻害剤 MQPA とトリプシンの複合体の立体構造分析を行ない、トリプシン族プロテアーゼの活性中心でのインヒビターのアミノ酸残基の配位についての重要な知見を得ている⁽¹⁹⁾。彼らはウシすい臓トリプシンインヒビター (BPTI) の反応部位の配列である Pro-Cys-Lys-Ala のリジン残基と MQPA のアルギニン部を重ね合わせて、トリプシン活性中心のポケット内で立体障害のないようにモデルを作成した結果、MQPA のキノリン部分骨格と BPTI の

表 4 ■ 種々のプロテアーゼ抑制剤および合成ペプチドの合胞体形成に及ぼす影響

抑制剤およびペプチド	最終濃度					
	3mM	1mM	300 μM	100 μM	30 μM	10 μM
UTI	NT	+	+	+	±	—
SBTI	+	+	±	—	—	—
PMSF	—	—	—	—	—	—
ロイペプチン	—	—	—	—	—	—
ペプスタチン	—	—	—	—	—	—
CTR 36	NT	+	+	+	±	—
NNT 24	NT	+	+	±	—	—

±: 0~30% 阻害, +: 30~60% 阻害, ++: 60~100% 阻害, NT: 未試験

Pro-Cys の骨格の配座が一致することを見いだした。筆者らはエピトープ β の Pro-Gly-Arg-Ala についても同様な配向が起こり得ると考えている。ここで問題となるのは、いわゆる対照ペプチドのことであろう。今回の筆者らの例のように、蛋白中の各部分のペプチドを合成し、その *in vitro* での見かけ上の活性が配列に特異的であるとの結論は、たとえばある部分配列を構成するアミノ酸の数と種類を固定してランダム配列にした数種類のペプチドを対照にすることで得られるかも知れない。今回筆者らは HIV の殻内蛋白 (p24) 中の部分配列 (320~337) を合成したペプチドを対照として用いたが、このペプチドはまったく阻害活性を示さなかった。

3. エピトープ β および ITI による合胞体* 形成の抑制

見かけ上エピトープ β が、抗トリプシン活性を示すことを確認した次に、筆者らはいわゆるアンタゴニスト活性を想定して NNT 24、および CTR 36 の合胞体形成抑制能を調べた。両ペプチドとも 300 μM 濃度以上で、合胞体形成を抑制した。また図 6 に示した蛋白のうちで、入手できた大豆トリプシンインヒビター (SBTI) およびヒト尿より精製したインター α -トリプシンインヒビター (UTI) および他のプロテアーゼインヒビターの合胞体形成に及ぼす抑制を調べた (表 4)。

SBTI は 3 mM~300 μM の濃度、また UTI は 1 mM~100 μM の濃度で合胞体形成を濃度依存性に抑制した。しかしロイペプチン、ペプスタチン

細胞が融合し、細胞質が混合して形成された多核細胞

は 3 mm の濃度でもプロテアーゼ活性を抑制せず、感染に際して筆者らの仮説どおり細胞側プロテアーゼが関与するとすれば、それはセリンタイプのプロテアーゼインヒビターである可能性が高い。

*

以上、エイズに関する臨床から HIV 感染に伴う筆者らのデータとアプローチ法を紹介した。特に中和エпитープのアミノ酸配列から HIV 感染に際し、細胞膜に存在するプロテアーゼを使用する可能性が強く示唆された⁽²⁰⁾。すでに gp 120 の前駆体である、gp 160 が gp 120 と gp 41 に成熟する際に細胞側のプロテアーゼを使用することも明らかにされてきた。また最近、血液腫瘍細胞の診断に使用されてきたモノクローナル抗体の認識する抗原がプロテアーゼであったという報告が相次いでおり、ここに述べた仮説を証明できるプロテアーゼの細胞側での証明は HIV 感染の機構をさらに明らかにするとともに、細胞生物学に新しいインパクトを与えるものと期待して小稿を閉じたい。

文献

- 1) 服部俊夫：科学，57，762 (1987)。
- 2) P. W. Berman *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5200 (1988)。
- 3) Editorial. Update: 'HIV-1 gene nomenclature', *AIDS Research and Human Retroviruses*, 4, VII (1988)。
- 4) D. Klatzmann *et al.*: *Nature*, 312, 767 (1984)。
- 5) Q. J. Sattentau *et al.*: *Science*, 234, 1120 (1986)。
- 6) B. A. Jameson *et al.*: *Science*, 240, 1335 (1988)。
- 7) L. A. Lasky *et al.*: *Cell*, 50, 975 (1987)。
- 8) L. R. Rusche *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3198 (1988)。
- 9) S. Matsushita *et al.*: *J. Virol.*, 62, 2107 (1988)。
- 10) C. B. Pert *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 9254 (1986)。
- 11) D. D. Ho *et al.*: *Science*, 293, 1021 (1988)。
- 12) 蛋白質核酸酵素，別冊 No. 29, “蛋白質・DNA のデータバンクと情報解析”，1986。
- 13) 西川 建：‘タンパク質の構造予測’，化学増刊 113 号，“プロテインエンジニアリング”，化学同人，1987，p. 61。
- 14) H. Takahashi *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 3105 (1988)。
- 15) H. Margalit *et al.*: *J. Immunol.*, 138, 2213 (1987)。
- 16) E. T. Kaiser: ‘Design of amphiphilic peptides’, “Protein Engineering”, ARL Inc., 1987, p. 193。
- 17) J. Goudsmit *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 4478 (1988)。
- 18) S. Modrow *et al.*: *J. Virol.*, 61, 570 (1988)。
- 19) T. Matsuzaki *et al.*: *J. Biochem.*, 103, 537 (1988)。
- 20) J. M. McCune *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53, 55 (1988)。

書 評

“化学物質による染色体異常アトラス”

環境化学物質，工業化学物質，食品添加物，化粧品，医薬品，農薬など，我々がその生活環境や職場環境から直接あるいは間接に受ける化学物質の遺伝的影響や発癌に対する関心が高まり，世界各国でその安全性を評価するための変異原性試験法のガイドラインが作られている。一般の生活環境の中に存在する化学物質の持つ遺伝毒性の評価も大きな関心事であるが，新たに導入あるいは排出される化学物質は過剰危険の要因として法的規制を受けることになる。わが国では変異原性試験の適正実施基準としてバクテリアを使った突然変異試験に加えて，哺乳動物系としては，培養細胞による染色体異常試験がガイドラインに定められている。培養系による染色体異常試験は哺乳動物細胞を対象とした試験法の中では

最も簡便な方法であるが，染色体異常の種類は多く，まの含まれるため，その分析技術の修得にはかなりの経験が必要とされている。しかし，ある特定の試験を法規制の中に盛り込むためには，分析基準の標準化が必要であるほか，試験結果には正確性と客観性が要求され，また国際的にも通用するものでなければならない。

本書は，実際に染色体異常試験に携わる人々の，このような必要性和要望に応じて出版された染色体異常の分類と判別に関する事例解説書である。構成は，第 1 章の総論と第 2 章の染色体異常アトラスから成っている。

第 1 章の総論は，(1) 染色体異常の意義，(2) 染色体異常の生成機構および異常の分類と判定，(3) 染色体標本の作製法，(4) 染色体異常試験のための統計処理法，(5) 変異原性試験法ガイドラインの国内外の動向の 5 節より成り，いずれも染色体異常試験の基礎およびその背景となるものである。

第1節ではヒトの先天異常や癌の染色体異常について概説している。染色体異常はそれ自身が遺伝的傷害の一種であり、直接的な係わりも関心の あるところであるが、染色体異常試験は、むしろバクテリアの試験と同様に突然変異性や発癌性の予測因子としての意義が深い。その理論的裏付けにもう少し重点をおいてほしかった。先天異常や癌の染色体異常に環境因子の作用が及んでいるかどうかは今後の重要な課題である。その意味でも、癌の染色体異常の項などで誤った記述が多少見られるのは残念である。

第2節には染色体異常の種類と判定の基準が詳しく述べられている。染色体異常を研究対象として扱う人にも一読の価値がある。ここで注目すべき点は、染色体（あるいは染色分体）の“ギャップ”と“切断”の分類に新しい基準を設けたことである。従来よりこの両者の分別は困難であり、議論の多いところである。ギャップは、淡染色性あるいは非染色性の間隙であるが、連続性は保たれているものを指し、不連続である切断とは生物学的意義が本来異なったものである。しかし、間隙の大きさのみでは区別できない。「ヒト染色体の命名に関する国際規約（ISCN 1985）」では、末端部が染色体の同軸上から外れているもののみを切断とし、他をすべてギャップとして扱っている。この場合、当然ギャップの中に真の切断も入ってくるが、確実性を重視した基準となっている。ところが、染色体異常試験の実際面では、この基準に従うとギャップのみを誘発するものがでてくる。そこで本書では、間隙が著しく大きいもの（染色分体の幅を大体の目安とする）は切断に分類し、そして淡染色性間隙など少しでも連続性の認められるものはギャップから除外することとした。切断の確実性が犠牲となり、生物学的な意義を考える場合に多少問題を残しそうであるが、これでギャップの判別の曖昧さが解消され、試験法としては客観性が著しく向上したと考えられる。

第3節では細胞培養や染色体標本の作り方が概説されている。培養細胞の凍結保存法なども述べられており参考になる。*in vitro* 試験では間接変異原の問題がある。代謝活性化は簡単に触れられているが、*in vitro* 試験の重要なポイントでもあり、もう少し詳しい説明が欲しかった。

第4節には分析結果の統計処理の方法が述べられている。化学物質による染色体異常は正規分布にもポアソン分布にも従わないことが多いため、特に弱い変異原性の場合など、試験結果の評価に関する統計的方法には議論

の多いところである。本書では、2, 3の方法が紹介されているが、いずれも概説的であり、処理方法の実際は挙げられた染色体異常の中にはその判別が必ずしも容易でないもげられている参考文献に頼らざるを得ない。実際のデータを挙げ、事例解説をするなど、もう少し親切さが欲しかった。

第5節には世界各国における変異原試験のガイドラインが挙げられている。これは、外国における動向を知る上でも、また輸出などに当たって相手国の規制の概要を知る上でも有用である。

第2章が本書の中心となるアトラス篇である。染色体異常試験によく使われる細胞の標準核型および染色体の異常の実際が写真により図示されている。いろいろな種類の染色体異常を含む150以上の分裂中期像が収録されているが、これには、およそ考えられる種類の異常はすべて含まれており、編集者の豊富な経験を思わせる。染色体異常の箇所はそれぞれ矢印で示されているが、その説明は欄外に記載されており、読者は染色体写真を顕微鏡像と同じように観察することによって異常の分類基準が修得できるように工夫されている。このようなアトラスはこれまでも類例がなく、染色体分析の実習書としても価値が高い。また、複雑な構造異常については可能な限りその起源と構造が模式的に図示され、理解を助けている。染色体異常試験をこれから始める人は、このアトラスを繰り返し観察して判定基準を修得し、またすでに従事している研究室でもこれを参考に各自の判定基準を見直してほしいというのが本書の主なねらいでもあると思われる。

染色体異常試験が、化学物質の審査および製造に関する法律の下で行なわれる以上、このような分析基準の標準化の試みはむしろ遅すぎた観もある。変異原性試験のガイドラインに染色体異常試験が採用されているわけであるから、その参考資料としての役割は大きい。新しい分類基準も含まれているが、それも用語の問題ではなく、試験結果により客観性をもたせるための分類基準として理解できる。本書は、日本環境変異原学会の編集となっているが、編集者はいずれも直接あるいは間接に化学物質の安全性評価側あるいは製造側に関係した研究者から構成されている。したがって、わが国における染色体異常試験に関する大方の合意であるという見方もできるかもしれない。（佐々木正夫）

（日本環境変異原学会 哺乳動物試験分科会編、）
B5判、198頁、6,800円、朝倉書店刊