

200727040A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

(H19-エイズ-若手-004)

HIV-1感染のヒト-ラット種間バリアーの解明

平成19年度 総括研究報告書

?

主任研究者 張 險峰

平成20(2008)年 4月

HIV-1感染のヒト-ラット種間バリアーの解明

主任研究者：張 陰峰（北海道大学 遺伝子病制御研究所 助教）

研究要旨

ラットはHIV感染モデルとして改良できる可能性を秘める。その為に、ラットでのHIV増殖非効率の原因を解明が重要である。当研究室の予備的結果で、ラットT細胞はHIVの侵入過程と感染性粒子形成の2段階で、他の種では見られない新規の阻害因子を持っていることが示唆された。本研究で、HIVの感染に対してラットが持つこの両阻害因子の同定するのを試した。19年度の研究結果として、HIVの効率的な複製を支持するラット細胞株の構築に成功した。ラットT細胞で作られるHIV-1粒子の感染性低下はENV蛋白に原因があることとラットApobec3は感染性低下の大きな要因ではないと明らかにした。HIVの侵入過程で働く阻害因子Candidateをいくつか同定したが、HIV-1感染耐性とは無関係であった。また、ラットTrim5はHIV-1の侵入過程を阻害しないが、生産過程を阻害することが見出した。

A. 研究目的

エイズの根本的な予防と治療法を開発するために、HIV感染小動物モデルはきわめて有用である。特に、ヒトCD4/CCR5等の受容体を発現させるとわずかにHIVの増殖を許すラットは良いモデル系に改良できる可能性を秘める。実際に、ヒトCD4/CCR5を発現するラットT細胞株に、HIV-1 RevのコファクターであるヒトCRM1と、TatのコファクターであるCyclinT1を発現させると、ヒトT細胞株の約1/3のHIV粒子が生産された。このことは粒子生産については、これらの因子を発現させることによりほぼ解決できることを示している。しかし、できた粒子の感染性が低く、侵入過程の効率も低いことが分かった(図1)。そこで、本研究の目的はウイルス粒子の感染性と侵入過程に関与しているウイルス性、細胞性因子を同定し、ラット感染モデルの作製に資することである。特に本年度は、①ラット上皮細胞から生産される高感染性と、T細胞からの低感染性のウイルス粒子を比較するための大量生産系の構築、②ラットT細胞由来のウイルスの感染性へのEnvの関与、③侵入過程で働くラット因子のクローニングを試みた。

B. 研究方法

①HIVウイルス粒子を大量収集するため、効率的な複製を支持するラット細胞の構築を行った。ヒトCyclinT1とCRM1を発現するレトロベクターをラット上皮細胞とT細胞株に感染させ、目的遺伝子を発現する細胞株を樹立した。HIV-1感染性クローンをリン酸化カルシウム法またはエレクトロポレーション法で種々の細胞株に導入し、HIV-1の増殖をHIV-1 p24 ELISA法で測定した(図2)。

②HIVの感染価を測定するために、indicator細胞(TZM-bl)に感染させ、感染に応じて生産されるルシフェラーゼ又はb-ガラクトシダーゼ活性を測定した(図3)。

また、Western blottingによってGagとGタンパク質を検出した。

③侵入過程で働くラット因子をクローニングするために、ラットprimary T細胞から抽出したmRNAを基にレトロベクターcDNAライブラリーを作成し、ヒトHeLa細胞にトランスデュースした。Venusを発現するHIVシュードウイルスを感染させて、Venus細胞をFACS Vantageで集めた。Venus細胞から、ベクター部分に設計したプライマーを用いてラットcDNAを回収した。cDNAの発現コンストラクトを作製し、HeLa細胞にトランスフェクション後、Venusを発現するHIVシュードウイルスの感染阻害効果を調べた(図5)。

④ラットTrim5aのHIV-1感染への影響を調べるために、ヒト293T細胞にHaloTagしたラットTrim5aを導入し、翌日Venusを発現するHIVシュードウイルスを感染させ、そのTrim5aと感染効率をFACSを用いて解析した。また、ラットTrim5aがHIV-1のウイルス産生に影響を与えるかどうかを調べるため、293T細胞にHalo-tagラット、AGM、ヒトTrim5a発現プラスミドとHIV分子クローンをco-transfectionし、二日後、培養上清及び細胞内Gagの産生量を調べました。

(論理面への配慮)

遺伝子組み換え実験は北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規程に沿って、許可を得た上、倫理規則を厳守した。HIV-1感染実験はP3実験室で行い、安全の面に十分配慮した。

C. 研究結果

1) HIV粒子の大量生産系の構築

レトロベクターを用いてヒトCyclinT1とCRM1を発現するラット上皮細胞株とT細胞株の構築に成功した。HIV-1DNAクローンを細胞株に導入し、ウイルス生産量を調べたところ、いずれの細胞からも数ng/mlオーダーのGagp24が生産された(図2)。この生産量は元の細胞株の百倍以上のウイルス生産量である。質量分析による粒子含有タンパク質の同定には数ugのウイルス粒子が必要だと推計されるために、11の細胞培養で事足りると計算される。

2)EnvのHIV粒子の感染性への関与
当研究室の初歩的な結果として、ウイルス粒子におけるGagの正常なプロセッシングを観察している。そこで、私はラットT細胞から生産されたHIV粒子は感染性減弱細胞性因子を含むと仮定して実験を進めてきた。しかし、これらはウイルス粒子を大量に調製できていない時点での結果であり、Western blottingはEnvタンパク質の比較的低感度の検出系であることを考慮して、ラットT細胞から生産されたウイルス粒子の感染性へのEnvの関与を再度調べた。もし、ラットT細胞由来のウイルス粒子のEnvの量的機能的な欠損が低感染性の原因であるならば、VSV Gタンパク質に置き換えたウイルス粒子を作製してやればヒト細胞由来のウイルスに匹敵する感染性を示すと予想される。そこで、Env欠損HIV-1とVSV-GをラットT細胞株に導入し、できたシュードウイルスの感染価を調べた。Apobec3が感染性を奪うとの報告が小糸博士から学会発表されている(ウイルス学会2006)ので、ラットApobec3をsiRNAでノックダウンしたラットT細胞も調べた。P24量を基準として同量のウイルスの感染性を測定したところ、ラットT細胞由来のウイルスの感染性は、ヒトT細胞であるMolt4細胞由来のウイルスよりも高い感染性を示し、G蛋白の量と関連していた(図4)。さらには、ラットT細胞由来のウイルスの感染性は、感染性HIV-1クローンとG遺伝子を293T細胞に共導入することによって作製したHIVと同等の感染性を示した。これらの事はGでコートされたラットT細胞由来のHIV粒子は十分に感染性を有することを示している。また、Apobec3をノックダウンすることによって、ウイルスの感染性が上昇するとの再現性のある結果を得られなかった。これらの結果から、ラットT細胞で作られるHIV-1粒子の感染性低下はENV

蛋白に原因があることが分かった。また、この実験系に於いてラットApobec3は感染性低下の大きな要因ではないと考えられた。

3) HIVの侵入過程で働く阻害因子の同定
レトロベクターを用いてラットcDNAを導入したHIV-1抵抗性のヒト細胞21クローンを得た。そのなかからactin related protein 2/3 complex subunit 1Aとribosomal protein S23、Ubiquitin-A-52 residue ribosomal protein fusion productの遺伝子を同定した。しかし、見出した遺伝子をさらに分析したところ、HIV-1感染耐性とは無関係であることが分かった(図5)。近年、HIV-1の感染を抑制する因子であるTRIM5aは注目されました。Old world monkeyのTrim5aはHIV-1の感染を抑制しますが、ヒトのTRIM5aは抑制しない。ラットはold world monkey同様HIV-1の侵入後の過程で感染阻害作用を示した。ラットTrim5aはヒトTrim5aと約50%の相同性をあり、サルやヒトのTrim5aと同様感染抑制機能領域のB30.2 (SPRY)ドメインを持つ(図6)。そこで、ラットTrim5aはHIV-1感染への影響を調べた。ラットTrim5aは感染を抑制効果がないことがわかった。一方、ラットAGM、ヒトTrim5aのいずれにおいても用量依存的にGagの産生量が抑制されることが見出した。

D. 考察

以前の当研究室における解析から、ラットT細胞由来のウイルス粒子はゲノムRNAを含み、Gagの正常なプロセッシングが起こっており、構造自体は正常だとみなしていた。しかし、今回、HIV-1 Env蛋白をVSV-Gと入れ替えることより、ウイルス粒子の感染性を完全に回復させることが分かった。この結果からラットT細胞由来のHIV-1粒子のEnvの機能が低い、もしくは取り込まれたEnvの蛋白量が少いことが考えられる。今後、ラットT細胞における、HIV-1Envの発現及び粒子のAssemblyに関わるEnv自身の性質と宿主因子の同定へと進んでいきたい。関連する細胞因子を同定するために、EnvのPull-down assayを検討し、Env糖鎖合成関連遺伝子に注目したい。

HIVの侵入過程で働く阻害因子をクローニングするために、スクリーニングする細胞を代えることを計画している。また、当研究室は、ヒト細胞と同様の感染

効率を示すラットT細胞株も有している
ので、侵入効率に関して両極をなすラットT
細胞の発現プロファイルをマイクロアレ
イにより比較し、候補遺伝子をしぼる方
法も試みたい。

E. 結論

ウイルス粒子を詳細に検討するために、
HIV-1の効率的な複製を支持するラット細
胞株の確立に成功した。ラットT細胞由来
ウイルス粒子の感染性低下の原因として
Envを見い出した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

なし

**H. 知的所有権の出願・取得状況（予定
を含む）**

該当なし

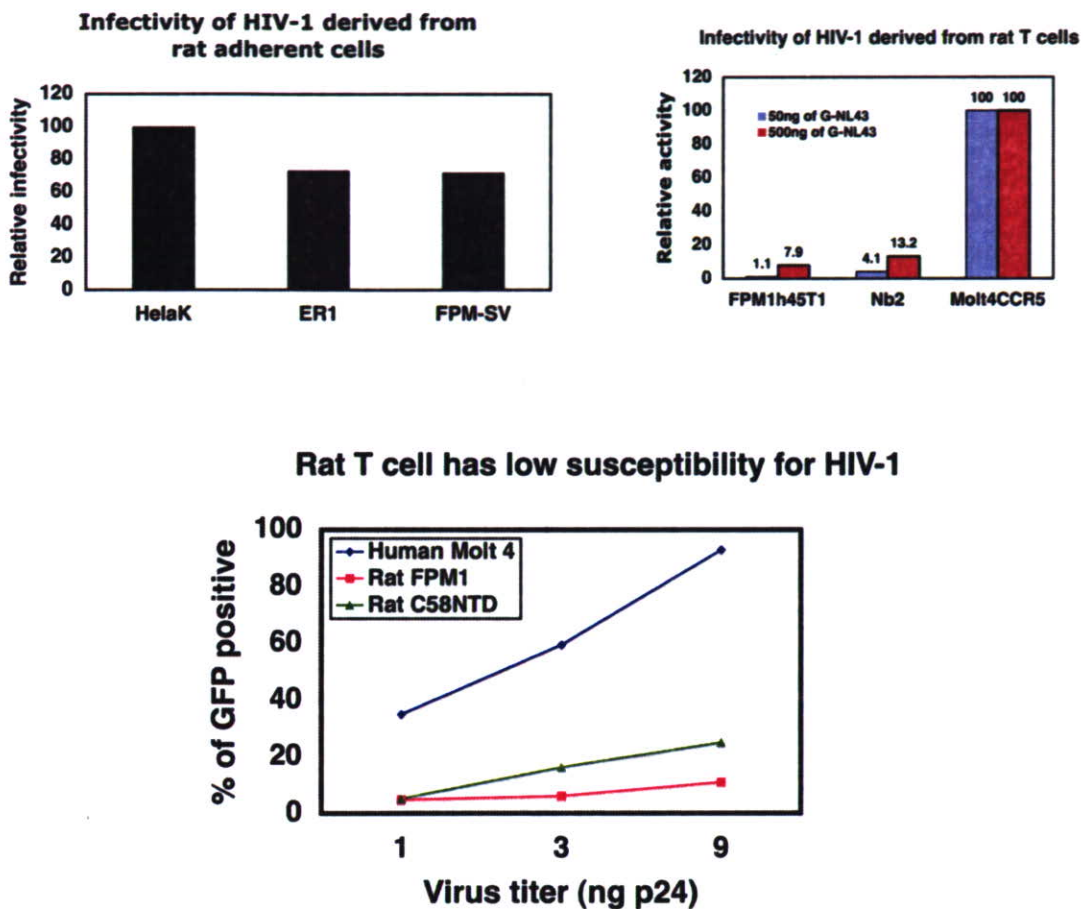


図 1. ラットT細胞は感染性粒子形成と侵入の段階での阻害因子を持っている

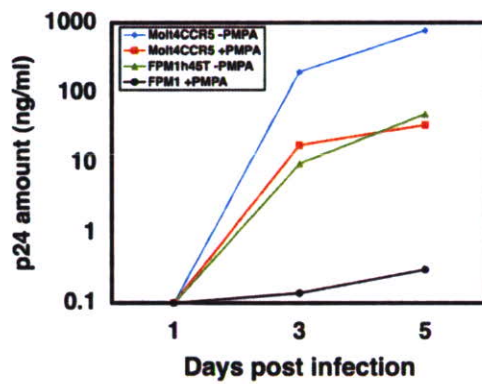
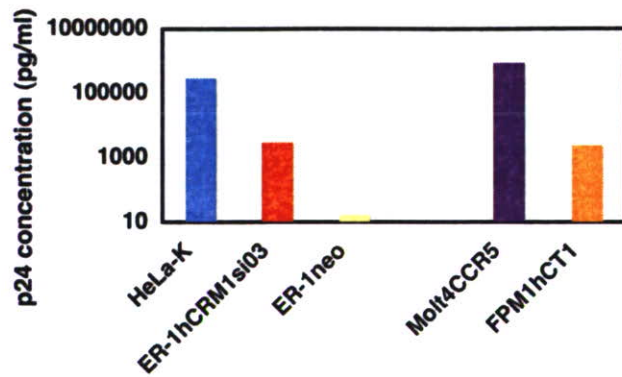
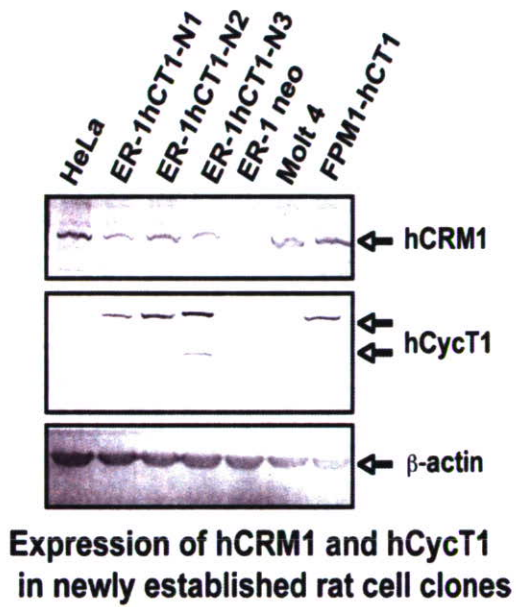


図 2. HIVの効率的な複製を支持するラット細胞株の樹立

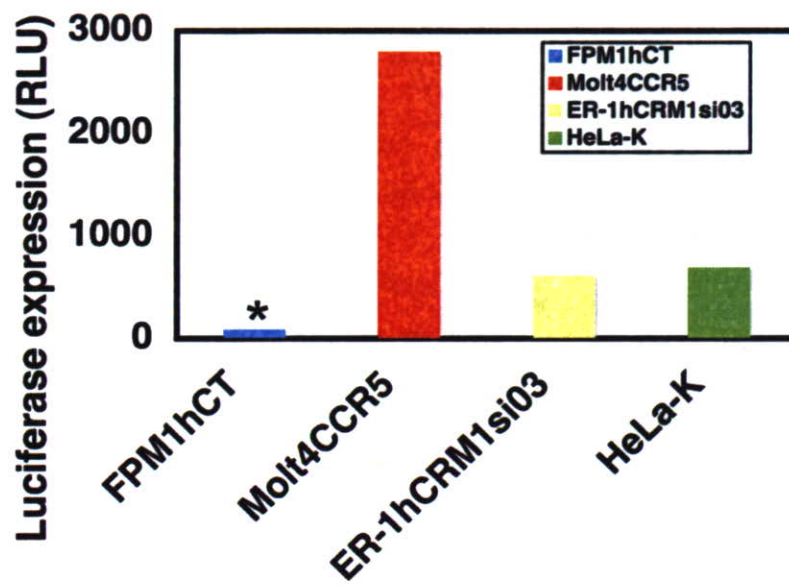


図3. ラットT細胞株から作られたHIV-1は感染性が低い

Infectivity of progeny HIV-1

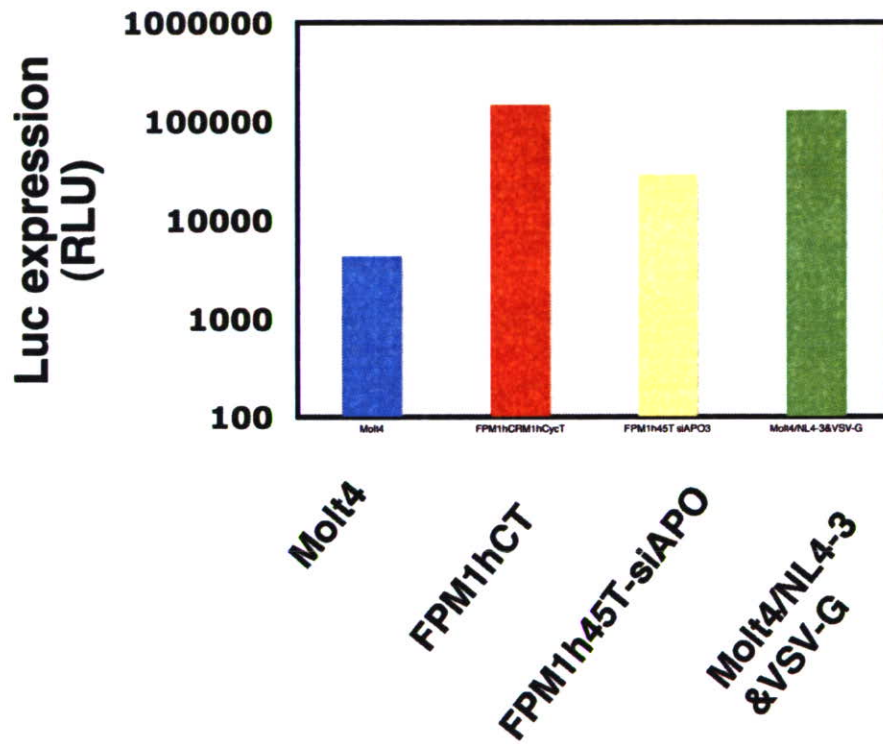


図4. Env蛋白をVSV-Gと入れ替えることより、ウイルス粒子の感染性が完全に回復

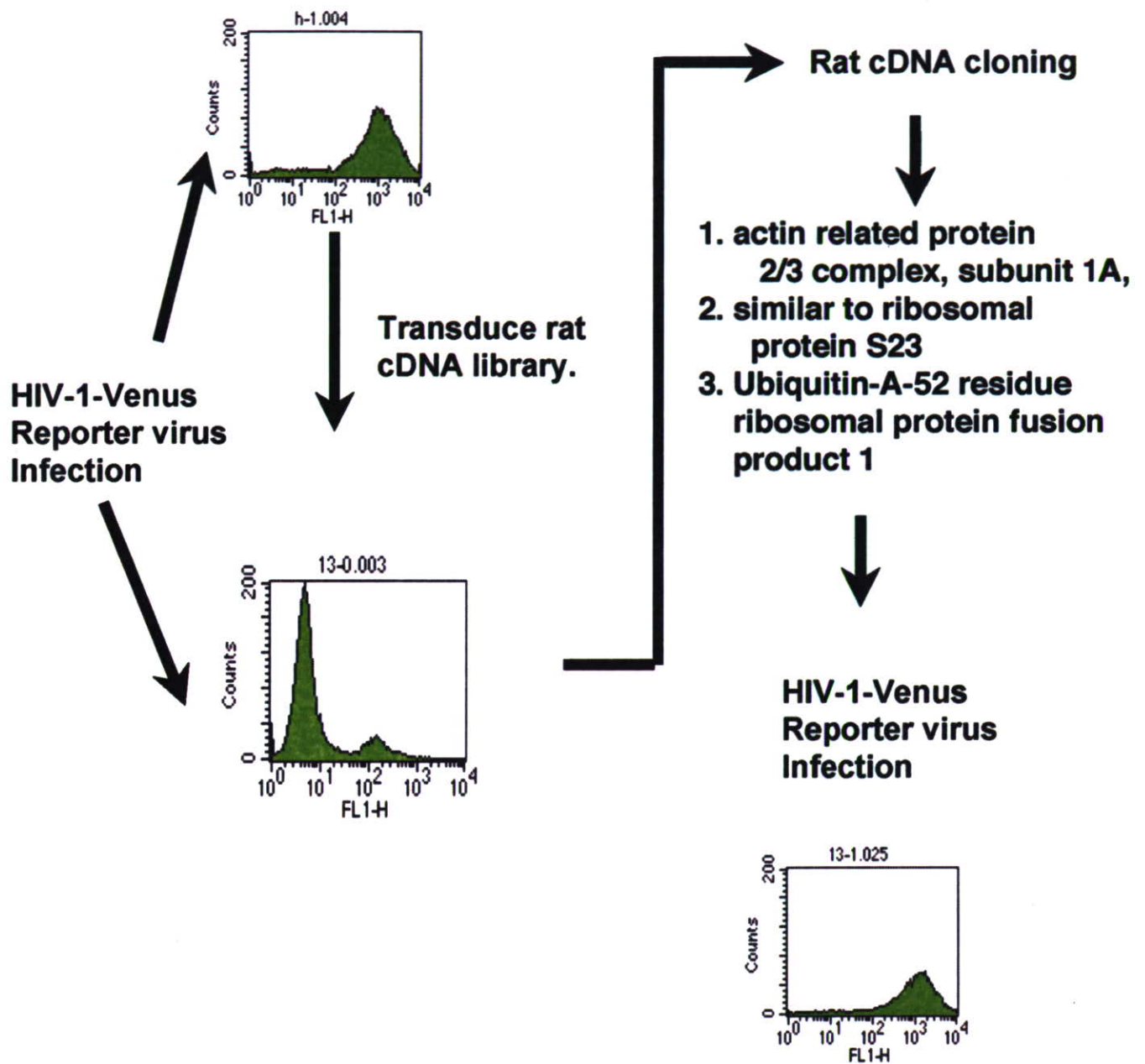


図5. HIVの侵入過程で働く阻害因子の同定

hu	1' MASGILVNVKEEVTCPICLLELLTQPLSLDCGHSFCQACLTANHKKSMLDKGESSCPVCRV	61' SYQPEMRRPVRHVNMMVEKLEVLKSPGQ-KVDHCAHGEKLLFCQEDGKVICWLCERS
*	** ..*
rat	1' MASEFVMLKEEVTCPICLDLNVPEVSGDCGHSFCQACITLVYSSKCKQDEFICPVCRV	61' SYLFXNL-PVRHVNMMVQLKEFKSSPEEPEKVLSCA-HGEKLLFCCKKMMPICWLCERS
hu	120' QEHGHTFTLTEEVAQEQVQLQALE-MLQKQEAEELEADIEEKASIKTQMVDKTV	179' LADFEQLDILDWEESELQLEKEEEDILKSLTNSETEMVQQTQSL-ELISOLEHRLQGS
	***** ..*	..** ..*
rat	119' QEHGHTFTLTEEVAQEQVQLQALE-MLQKQEAEELEADIEEKASIKTQMVDKTV	179' QSEFKQMDIMDSEEEKELQKLMQEKEDIKNSLESENEYSQQSKLLGDLILDVEHQLQCS
hu	238' VMELQGVDMKTEENTLKKPETPKQVFRAPDLQMLEVF-ELTDVRRYVQVTVAP	297' NNISSCAVISEDQVSSPKPQMMYGARGTYQTFVNFNYCTGILGSSQISGKHYNEVDYSK
*	..** ..*
rat	239' ATEMLQGVDMKTEENTLKKPETPKQVFRAPDLQMLEVF-ELTDVRRYVQVTVAP	299' SNNPNIFFITADK-----QMYEDQAHFARPTENCHAGVLGYPAIQSGKHYNEVDYSG
hu	357' KTAMILGVCAG-----FQPDAMCNIEKNENYQPKYGYVM	392' GLEEGVKCSAFQDSSFHTPSVPIVPLSVIICPDRVGVFLDYEAQTVSFFNLTNMGFLIY
*	** ..*
rat	352' KGSNVLGLSDGSYLFNPMFRSNAEPPNPPLFRLLNSDHSRLSLSNDSHYQPKYGYVM	412' GLWNSVYNAFEECTF--TGKPSVLTLSLMMRRCRVGIFLDCAAGTLSFYNSNMGTLIY
hu	452' KFSHCSFSQPVFPYLNPK-CGVPMILCSPSSM	
*	
rat	470' -FCAGSFPD-VFPYFNPMSSEPLTMCNPDS	

図6. Human Trim5aのhomologとしてのラットTrim5