

200932040A

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感染のヒトーラット種間バリアーの解明

平成21年度 総括研究報告書

研究者代表者 張 陰峰

平成22(2010)年 5月

厚生労働科学研究費補助金（エイズ対策研究事業）
総括研究報告書

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

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を目的にした。本年度は、HIV-1の侵入過程で働く阻害因子の同定を中心に研究を行った。マイクロアレイ法により新規HIV-1侵入過程で働く阻害因子を同定した。またヒトTRIM5 α がHIV-1産生を阻害することが明らかにした。

1. 研究目的

HIV-1感染小動物モデルの開発は、エイズ研究の重要なテーマである。当研究室ではラット感染モデルの改良を進めており、ヒトCCR5, CXCR4, CD4, CRM1, CycT1の5種のヒト遺伝子を発現するTgラットの作製に成功した。このラットは近交系であり、完全な免疫系を有し、遺伝子操作が可能な点、詳細な免疫学／遺伝学的解析を可能とする。しかし、それでも、人と同等の感受性を有し、AIDS発症が可能な動物モデルとするには改良が必要である。本Tgラットがまだ人と同等のHIV-1の増殖を許さない原因は、単なるHIV-1増殖に必須の因子の欠損ではなく、ウイルス抑制因子を持つことにあると考えられる。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を目的にした。本年度は、HIV-1の侵入過程で働く阻害因子の同定を中心に研究を行った。

2. 研究方法

1) マイクロアレイ法により侵入過程で働く阻害因子の同定

1. HIV-1侵入効率に関して両極をなし、更にサイクロスポリンA(CsA)を作用させると感染効率が異なるラットT細胞株であるFPM1, C58NTD, NB2のTotal RNAを精製し、Agilent社によりcDNAマイクロアレイを作製し、GeneSpringGX及びGenMAPPのソ

フトウェアで各細胞の遺伝子発現プロファイルを比較した。

2. 候補cDNA発現コンストラクトを入手し、ヒト293T細胞に発現させ、VENUSを発現するHIVシュードウイルス(HIV-Venus)を感染させ、FACSによるHIV-1感染阻害効果を調べた。

2) Functional Cloning法による侵入過程で働く阻害因子の同定

1. HIV-1侵入効率の低いラットT細胞株から抽出したmRNAを基にレトロベクターcDNAライブラリーを作成し、ヒトMolt5CCR5細胞にトランスデュースし、ラット遺伝子発現細胞群を構築した。HIV-Venusを感染させて、VENUS⁺細胞をFACSvantageの自動細胞捕集装置で回収し、細胞をクローニングした。

2. ベクター部分に設計したプライマーを用いて、VENUS⁺細胞からラットcDNAを回収した。

3. cDNAの発現コンストラクトを作製し、293T細胞にトランスフェクション後、HIV-venusの感染阻害効果を調べた。

3) ヒトTrim5 α のHIV-1産生の抑制効果の検討

1. ヒト Trim5 α の過剰発現によるHIV-1産生の抑制効果

アカゲザル、ヒトTRIM5 α 、またはSPRYドメインに点変異した変異体をHIV-1分子クローンと293T細胞に導入し、細胞内または培養上清中にHIV-1 Gagの量をp24 ELISAまたはwestern blotで検討した。

2. 内在性ヒトTrim5 α のHIV-1産生の抑制効果

HIV-1分子クローンを導入したヒトHT1080またはJurkat細胞に抗TRIM5 α siRNAをlipofectamineまたはnucleofectionにより導入し、培養上清中のHIV-1 Gagの量を測定した。

3. ヒトTrim5 α のHIV-1粒子内への取り込み

培養上清を20% sucrose層にのせ、超遠心によってHIV-1粒子を濃縮した。ウイルス粒子をWestern blotによってTrim5 α とGag蛋白質を検出した。

4. Tgラット由来primary細胞における

HIV-1複製の解析

ラットprimary細胞へHIV-1を導入するため、ヒトCD4/CCR5/CXCR4/CyclinT1/CRM1 Tgラットから昨年度と同様primary T細胞とマクロファージを調製した。VSV-G coated HIV-1を感染させた。HIV-1の増殖をHIV-1 p24 ELISA法で測定した。

(論理面への配慮)

本研究動物実験については、厚生労働省基本指針と北海道大学動物実験機関内規程に沿って行い、動物愛護の精神で動物に与える苦痛の軽減と排除に勤めた。

3. 研究結果

1. HIV-1侵入過程で働く阻害因子の同定

各ラットT細胞株の遺伝子発現プロファイルを分析した。侵入効率の低い細胞株において、侵入効率の高い細胞株より発現が10倍以上高い遺伝子の発現クローンを46個入手し、293T細胞に発現させ、HIV-1の感染の抑制効果を評価したところ、HIV-1感染抑制効果のあるラット宿主因子が1種類同定できた。この因子はラットJunBであり、転写因子、癌遺伝子として知られている。HIV-1感染またはウイルス増殖に関与する情報は現在まで報告されていない。

HIV-1の感染効率が低く、CsA処理により感染効率が上がる細胞で発現が高く、HIV-1感染効率が高く、CsA処理で下がる細胞で発現が低い遺伝子の発現クローンを18個入手し、293T細胞に発現させ、HIV-1の感染への影響を調べた。その結果一つの分

子クローンgene X(特許申請の関係で遺伝子名を伏せさせていただきます。)がHIV-1感染を顕著に抑制した。Gene XはDNA, RNAとの結合能を持ち、胚の発達の調節、アポトーシスの制御などに関与する因子である。しかし、gene Xノックアウトマウスは生存可能である。

一方、Functional cloning法を用いて、ラットcDNAを導入したHIV-1抵抗性のMolt4CCR5細胞をスクリーニングした、その中からHIV-1感染効率がサルTRIM5 α 発現Molt4CCR5と同程度、又はより低い細胞クローンを32個得た。現在そのクローンからcDNA発現コンストラクトを作製し、ヒト細胞に発現させることによるHIV-1感染阻害効果を調べている最中である。本年度中にHIV-1感染阻害因子の同定ができる見込みである。

2. ヒトTrim5 α のHIV-1産生の抑制効果

ヒトTrim5 α のHIV-1の複製への影響を調べ、以下のことを明らかにした。過剰発現したヒト野生型のTrim5 α はアカゲザルと同程度、量依存的にHIV-1 Gagの産生を抑制した。また、437番目アミノ酸がアルギニンからシステインへ変異しているヒトTrim5 α 変異体(R437C)はGagの産生を抑制しなかった。ヒトHT1080細胞とJurkat細胞ではsiRNAでTrim5 α をノックダウンすることにより、Gagの生産量が約2倍から3倍増加した、一方、元々Trim5 α の発現が少ない293T細胞では、Gagの生産量に変化はなかった。野生型のヒトTrim5 α はわずかにHIV-1粒子に取り込まれた。R437C変異体の粒子への取り込みは更に少なかった。野生型ヒトTrim5 α がMLV-Nの感染を抑制するのに対し、R437C変異体は抑制しなかった。

3. 新規に作成したTgラットにおけるHIV-1複製の解析

当研究室でヒトCD4/CCR5/CXCR4/CyclinT1/CRM1 Tgラットの作製に成功したので、このTgラットにおけるHIV-1の複製を解析した。

まず、本Tgラットから肺胞マクロファージを調製して、EGFPをコードする HIV-1 AD8株を感染し、GFP陽性細胞の割合をFACSで測定する事により、感染効率を調べた。その結果、ラットマクロファージへの感染効率はヒトマクロファージ以上である事が分かった。このことは、ラットマクロファージにおいては侵入過程で阻害因子が存在しないことを示唆している。

また、このTgラットのマクロファージから作られたウイルス産生量を測定したところ、ヒト細胞に準じるものである事（1/6-1/2まで）が分かった。更に、産生されたウイルスはR5 type、X4 typeともに高感染性であることが分かった。これらの事により、ラットマクロファージにおいては侵入過程、粒子形成過程においても阻害因子が存在しないと示唆された

一方、TgラットからT細胞を調製し、Gタンパク質でコートした、GFP発現HIV-1の感染効率を測定したところ、ラットT細胞への感染効率はヒト細胞より低いことを確認した。このことは、ラットT細胞には侵入過程で働く阻害因子があることを示唆している。

しかし、HIVゲノムをTgラットprimary T細胞に導入すると、ヒトPBLの約3分の1のウイルスが生産された。また、primary T細胞からの子孫ウイルス(NL4-3, AD8, JR-CSF)に感染性があることが分かった。このことは、上記ラットT細胞株を用いた結果と異なり、実際にラットにおけるHIV-1感染性粒子を生成する過程で厳密なブロックがないことを示唆している。

4. 考察

マイクロアレイ法により新規HIV-1侵入過程で働く阻害因子を同定した。同定されたラットJunBは転写因子であり、他の宿主因子の発現を制御することによりHIV-1感染を阻害する可能性が考えられる。

従って、JunBは直接の侵入阻害因子ではないと思われる。

ラットgene Xは直接HIV-1感染を阻害する可能性を持ち、さらに解析を進める予定である。さらに、他のレトロやレンチウイルスの感染にも抑制効果を持つ可能性を検討したい。

昨年hCRM1とhCycT1を発現するTgラットから高感染性のHIV-1がヒト細胞に準じる量（1/10-1/3）生産されるとの結果から、ラットでは、HIV-1感染の後期過程において種間バリアーが存在しないと考えた。しかし、本年度、他の研究グループよりラットCD317 (Tetherin)がHIV-1粒子の放出を抑制するとの報告があった。これらの結果を基にヒトCCR5, CXCR4, CD4, CRM1, CycT1 TgラットとgeneX/CD317ノックダウン/アウトラットを交配することにより高感受性HIV-1感染ラットモデルを作製したい。

ヒトTRIM5 α がHIV-1産生を阻害することと本計画初年度で見出した過剰発現ラットTRIM5がヒトTRIM5 α と共にHIV-1のGag蛋白の生産を抑制するとの結果から、ラットTRIM5をノックダウンする事によって、更なるHIV-1感染ラットモデルの改善が期待される。

5. 自己評価

1) 達成度について

3年の研究期間で新規HIV-1侵入過程における阻害因子の同定に成功した。また19,20年度hCRM1, hCycT1 Tgラットからヒト細胞に準じる量の感染性HIV-1が生産されるとの研究結果を報告した。従って、本研究は概ね最初の研究計画通り進行した。

2) 研究成果の学術的、社会的意義について

本研究で同定された阻害因子をノックダウン/アウトする事により、HIV感染ラットモデルの作成しうる。このラットは完全な免疫系を有し、特別な技術や設備を持たない研究グループでも広く利用できる。新しい治療と予防法開発のために有用である。さらに、本ラットは近交系であるために詳細な免疫学的手法が利用でき、かつ発生工学の手法に

より免疫系遺伝子等を欠損させることを通じて、HIVの複製／発症に関与する因子の同定にも寄与できる。同定された阻害因子がファミリーをなしている可能性も高く、HIVの感染に限らず、他のレンチウイルスの感染抑制への効果も考えられ、げっ歯類がレンチウイルスfreeであることの原因の解明につながる。

3) 今後の展望について

同定された阻害因子のHIV-1感染への抑制機序を分子レベルで解明したい。また同定された阻害因子のノックダウンラットを作製し、HIV-1感染モデルとしての有用性を検討したい。

6. 結論

HIV-1侵入過程で働く阻害因子を同定した。
この研究結果はHIV-1感染ラットモデルの作成にむけて大きな貢献が期待できる。

7. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

新規ラットHIV感染阻害因子について、出願検討中。

研究発表

論文発表

1. Hiroyuki Okada, Xianfeng Zhang, Ismael Ben Fofana, Mika Nagai, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi, and Hisatoshi Shida. Synergistic effect of human-CycT1 and -CRM1 on HIV-1 propagation in rat T cells and macrophages
Retrovirology 2009, May 12; 6:43
2. Xianfeng Zhang, Yoko Aida. HIV-1 Vpr: a novel role in regulating RNA splicing
Curr HIV Res 2009; 7(2): 163-8
3. Xianfeng Zhang, Mariko Kondo, Jing Chen, Hiroyuki Miyoshi, Hajime Suzuki, Takashi Ohashi, Hisatoshi Shida
Inhibitory effect of human TRIM5a on HIV-1 production. Microbes and Infection 2010, in press.

学会発表

張 陔峰、大橋 貴、志田 壽利

ヒトTrim5 α によるHIV-1産生の抑制効果 第57回日本ウイルス学会

