

200932046A

厚生労働科学研究費補助金  
エイズ対策研究事業  
(H21-エイズ-若手-018)

HIV が形成する高分子複合体の機能不全化と  
それを応用したウイルス制御法の確立に関する研究

平成 21 年度総括報告書

研究代表者 鈴木 陽一  
(京都大学ウイルス研究所)

平成 22 (2010) 年 5 月

## 目 次

I.	総括研究報告	
	HIV が形成する高分子複合体の機能不全化と それを応用したウイルス制御法の確立に関する研究 -----	1
	鈴木 陽一	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	----- 10
III.	研究成果の刊行物・別刷り	----- 11

## HIV が形成する高分子複合体の機能不全化と それを応用したウイルス制御法の確立に関する研究

研究代表者 鈴木 陽一 京都大学ウイルス研究所 准教授

**研究要旨** 現在の HIV-1 感染症ならびにエイズに対する薬剤治療は多剤併用療法 (HAART) が中心であるが、数種の化学薬剤を服用することに伴う副作用や耐性ウイルスの出現が問題となっている。これらの問題を克服するためには、新規薬剤のさらなる開発だけでなく、その効果を高める新しい治療システムの確立が必要である。本研究では、ウイルスゲノムが感染細胞内で形成するインテグレーション複合体 (PIC) に着目し、この高分子複合体の機能を制御する細胞性因子の解析をおこなった。その結果、細胞性キナーゼ VRK が見出された。この分子は PIC の重要な構成因子である BAF をリン酸化し、ウイルス DNA から BAF を解離させることで、最終的に PIC のインテグレーション活性を喪失させる。そして、本研究で確立した HIV-1 PIC の試験管内評価システムによって、ヒト VRK は HIV-1 PIC のインテグレーション活性も抑制することが明らかとなった。また本研究では、インテグレーションを触媒するインテグラーゼに会合する細胞性因子として、E3 ユビキチンリガーゼ Huw1 を新規に同定した。しかし、Huw1 はインテグレーション過程ではなく、感染性 HIV-1 の形成段階を負に制御する可能性が示唆された。

### A. 研究目的

エイズは HIV の感染によって引き起こされる疾患であるが、我が国では数種の抗ウイルス剤を併用する HAART 療法の実施によって致死性の疾患から慢性感染症へと認識が変わりつつある。しかし、症状の悪化を食い止めるためには化学合成された薬剤を長期にわたって服用せねばならず、また一度耐性ウイルスが出現すると対抗手段が取りにくいという課題も残されている。これらの問題は特に長期療養を受けなければならない感染者にとって、肉体的、精神的、そして経済的な負担を強いるものとなる。よって、今後のエイズ対策に求められるのは、新規薬剤の開発もさることながら、従来の化学療法の欠点を補う新しい治療シ

テムの構築であろう。本研究では、生体、特に細胞が本質的にもつ HIV 抑制機構を解析し、その制御メカニズムを明らかにすることによって、現存する化学療法と併用可能な新しいエイズ治療戦略の道筋を見出すことを目的とした。

HIV の複製にはウイルス DNA の合成と組み込み、そしてそれに続くウイルス遺伝子の発現が必須であるが、この一連のプロセスはウイルスゲノムの形態が RNA から DNA へ、そして再び RNA へと変化する極めてダイナミックな反応であり、これらを完遂するためにウイルスは様々な蛋白質とともに細胞内で高分子複合体を形成しなければならない。本研究ではこのウイルスゲノムを中心とした蛋白質複合体 (ヌクレオプロテイン複合体) に着目し、その機能不

全化を引き起こす細胞性因子の同定と解析を試みる。平成21年度は、逆転写反応によって合成されたウイルス DNA を感染細胞の染色体に組み込む際に形成されるインテグレーション複合体 (preintegration complex: PIC) について、その機能に影響を及ぼす細胞性因子の検討と作用機序の解析をおこなった。

## B. 研究方法

### 1. PIC の調製

本研究では HIV-1 だけでなくモロニーマウス白血病ウイルス (MoMLV) 感染細胞由来の PIC も実験サンプルとして用いた。MoMLV PIC を調製するために、NIH3T3 細胞とウイルス産生細胞株 (Clone4 細胞) を polybrene の存在下で 18 時間共培養した。ウイルス感染細胞は回収後、0.025% ジギトニンを含む緩衝液で処理し、細胞質分画を抽出した。この細胞質分画を PIC サンプルとして以降の実験に用いた。

HIV-1 PIC を調製するために、まず GFP 遺伝子をもつ HIV-1 ベクターを作製した。HIV-1 ベクター遺伝子をコードするプラスミド DNA (pLTIG) と、Gag/Pol 発現プラスミド、Rev 発現プラスミドならびに VSV-G 発現プラスミドを 293T 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の培養上清をウイルス溶液とした。HIV-1 ベクターの感染価はベクター遺伝子がコードする GFP 蛋白質の発現を指標にして算出した。トランスフェクションに用いたベクタープラスミドを取り除くため、ウイルス溶液を DNase 処理し、HeLa 細胞に MOI=10 で感染させた。感染細胞は 6 時間後に回収した。MoMLV PIC の調製と同様、ジギトニンを含む緩衝液を用いて細胞質分画を抽出し、これを HIV-1 PIC サンプルとした。

### 2. 組換え蛋白質の調製

*In vitro* 実験に用いたすべての組換え蛋白質は大腸菌で発現させ、FPLC によるアフィニティ精製ならびに限外濾過精製によって作製した。

### 3. *In vitro* integration activity assay

HIV-1 もしくは MoMLV 感染細胞から抽出した PIC は、インテグレーション反応の標的 DNA であるバクテリアファージ ΦX174 DNA とともに試験管内で、37°C で 30 分間インキュベーションした。精製したウイルス DNA はアガロースゲル電気泳動法で分離し、ウイルス DNA の LTR 配列に対するプローブを用いたサザンブロットイング法によって検出した。MoMLV DNA 検出の際には、インテグレーションされたウイルス DNA をより明確に識別するために DNA サンプルを *Bam*HI で消化し、サザンブロットイング解析に用いた。

### 4. BAF のリン酸化実験

BAF のリン酸化反応は、GST 融合 VRK (GST-VRK) ならびに BAF を ATP と Mg<sup>2+</sup> の存在下でインキュベーションし、[γ-<sup>32</sup>P ATP]を用いたオートラジオグラフィ法、もしくは抗 BAF 抗体を用いたイムノブロットイング法によって検出した。同様のリン酸化実験は、BAF と DNA (700 bp) で形成した複合体を基質としてもおこなった。

### 5. IN 結合性因子の解析

2 種類のアフィニティタグ配列 (protein G タグおよび streptavidin binding peptide タグ) を配位した MoMLV IN を NIH3T3 細胞に発現させ、その細胞溶解液から IN に会合する蛋白質複合体を tandem affinity purification によって抽出した。蛋白質群は SDS-PAGE で分離後、質量分析法によって同定した。同定された蛋白質と IN との結合は共免疫沈降法によって確認した。

### 6. HIV-1 感染実験

HIV-1 を用いた感染実験は、複製可能な HIV-1 NL4-3 株、もしくはルシフェラーゼ遺伝子をもち VSV-G 蛋白質でシェードタイプした複製不可能な HIV-1 ベクター (HIV-Luc) を MT-4 細胞に感染させることによりおこなった。また、HIV-1 の感染性の評価は TZM-bl 細胞を用い、TZM-bl 細胞がコードするルシフェラーゼ遺伝子の発現を測定することでおこなった。

### 7. RNA 干渉法実験

Huwei ノックダウン実験は、インビトロジェン社の BLOCK-iT Pol II miR RNAi システムを用いておこなった。

#### (倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたり、感染実験もしくは遺伝子導入実験で HIV-1 ならびに MoMLV を用いることが必要であるが、研究代表者の所属する研究室には P2 および P3 レベルの物理的封じ込め施設が完備されている。また本研究室では HIV を含めたウイルス感染実験に必要な組換え実験は、京都大学の組換え DNA 委員会、ならびに文部科学大臣による第二種使用等拡散防止措置の承認を受けている。

### C. 研究結果

#### 1. HIV-1 PIC 活性評価システムの確立

研究代表者は先行研究にて、MoMLV 感染細胞から抽出した PIC を用い、その機能に関わる分子の解析をおこなってきた (Suzuki *et al.*, *EMBO J.*, 2004)。本研究では HIV-1 PIC の活性を *in vitro* で評価する必要があるが、HIV-1 PIC の解析は世界でもごく限られた研究室でしかおこなわれていない。そこで、研究代表者が MoMLV PIC の研究で取得した知識をもとに、HIV-1 PIC の抽出法、ならびにその試験管内活性評価法の確立をおこなった。

ウイルスは VSV-G 蛋白質でシュードタイプした GFP 遺伝子をもつ HIV-1 ベクターを用いた。ウイルス作製時に用いたプラスミド DNA の混入を避けるため、HIV-1 ベクター溶液は感染前に DNase 処理をした。様々な標的細胞と感染時間を検討し、最終的に  $2 \times 10^6$  個の HeLa 細胞に MOI=10 に相当する HIV-1 ベクターを 6 時間感染させた。感染細胞は回収後、界面活性剤であるジギトニンを用いて PIC が含まれる細胞質分画を抽出した。この細胞質分画に標的 DNA として  $\Phi$ X174 DNA (5.5 kb) を加え、37°C で 30 分インキュベーションし、インテグレーション反応をおこなった。HIV-1 DNA は精製した後、LTR 配列に対するプローブを用いて、サザンブロット法によって検出した。図 1 に示されたように、HIV-1 PIC サンプルに標的 DNA を加えると、基質となるウ

イルスベクター DNA (5 kb) と DNA 標的 DNA のインテグレーション産物 (10.5 kb) が確認された。

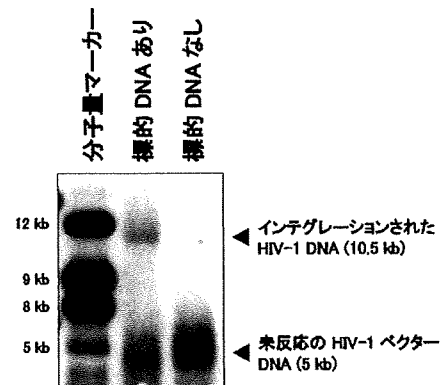


図 1. HIV-1 PIC を用いた *in vitro* integration activity assay.

#### 2. 細胞性キナーゼ VRK1 による BAF/DNA 複合体の破壊

これまでに、HIV-1 を含むレトロウイルスの PIC の細胞性構成因子として barrier-to-autointegration factor (BAF) が知られている。BAF は DNA 結合性蛋白質であり、細胞核のクロマチン構造の維持に関与していると考えられているが、PIC 内ではウイルス DNA に直接結合し、インテグレーション活性を高めていることが報告されている。BAF は細胞周期依存的にリン酸化され、最近、そのリン酸化修飾を触媒するキナーゼとして vaccinia-related kinase (VRK) が同定された。興味深いことには、リン酸化修飾によって BAF はその DNA 結合活性を失ってしまう。そこで、VRK によって BAF をウイルス DNA から解離させれば、PIC のインテグレーション活性を抑制できるのではないかと考えた。

この仮説を検証するために、まず BAF と DNA の単純なヌクレオプロテイン複合体を形成し、VRK がこの複合体から BAF を解離できるか否かを検討した。VRK ファミリーのひとつである VRK1 を GST 融合蛋白質として作製した (GST-VRK1)。BAF に対するキナーゼ活性は *in vitro* リン酸化実験で確認した (図 2-1)。そして、BAF と 700 bp の DNA を 30°C で 30 分インキュベーションす

ることによって BAF/DNA 複合体を形成し、ATP と  $Mg^{2+}$  の存在下で GST-VRK1 を処理した。DNA 複合体の形成状態をアガロースゲル電気泳動法によるゲルシフトアッセイで解析したところ、GST-VRK1 を処理したサンプルでは BAF/DNA 複合体が確認されなかった (図 2-2)。このことは VRK1 が BAF と DNA の解離を引き起こせることを示している。

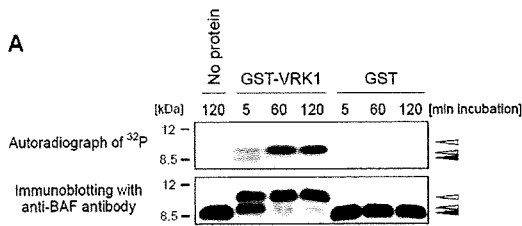


図 2-1. GST-VRK1 による BAF のリン酸化。組換え体 VRK1 と BAF を ATP ならびに  $Mg^{2+}$  の存在下でインキュベーションし、SDS-PAGE で分離した。上のパネルは  $[g-^{32}P]$ ATP を用いたオートラジオグラフィ法、下のパネルは抗 BAF 抗体を用いたイムノブロッティング法による検出結果。

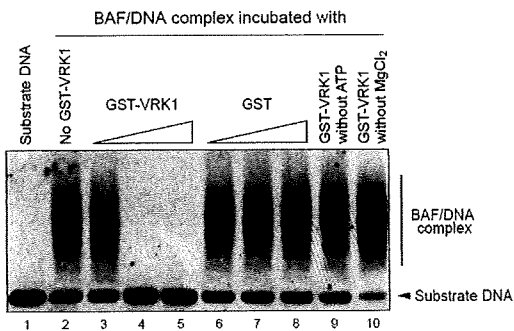


図 2-2. VRK1 による BAF/DNA 複合体の破壊。基質 DNA (レーン 1) と BAF をインキュベーションすることで BAF/DNA 複合体を形成し (レーン 2)、GST-VRK1 を処理した (レーン 3~5)。処理後のサンプルはアガロースゲル電気泳動法によって分離し、基質 DNA の位置をサザンブロッティング法で検出した。

### 3. VRK1 による PIC からの BAF の解離

免疫沈降法を用いた先行研究では、BAF が MoMLV PIC の細胞性構成因子であり、

PIC を高濃度 (750 mM) の塩で処理することによって BAF が PIC から解離することを示している (Suzuki and Craigie, *J. Virol.*, 2002)。VRK1 処理によっても同様に PIC からの BAF の解離を引き起こせるかどうかを調べるため、MoMLV PIC をモデルサンプルとして用い、ATP と  $Mg^{2+}$  の存在下で GST-VRK1 を処理した。抗 BAF 抗体を用いた免疫沈降法によって BAF の結合状態を解析したところ、GST-VRK1 を処理した PIC は抗 BAF 抗体で免疫沈降されなかった (図 3)。よって、VRK1 は PIC から BAF を解離

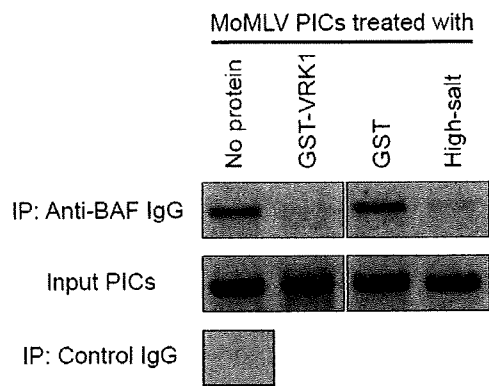


図 3. VRK1 による MoMLV PIC からの BAF の解離。MoMLV 感染細胞から抽出した PIC に GST-VRK1 を添加し、インキュベーションした後、抗 BAF 抗体を用いた免疫沈降をおこなった。免疫沈降された PIC に含まれるウイルス DNA は精製後、アガロースゲル電気泳動によって分離し、LTR 配列に対するプローブを用いたサザンブロッティング法によって検出した。High-salt は高濃度の塩で処理した PIC を示す。

### 4. VRK による PIC インテグレーション活性の抑制

つぎに、PIC 機能に対する VRK1 の影響を調べた。まず、MoMLV PIC を GST-VRK1 で処理し、 $\Phi$ X174 DNA を標的 DNA として用いた *in vitro* integration activity assay によって、インテグレーション活性の変化をみた。その結果、MoMLV PIC のインテグレーション活性は GST-VRK1 の処理によって強く阻害されることが示された (図 4-1)。また、この抑制は VRK1 の活性ドメイン変異体 (GST-VRK1<sup>D177A</sup>) では観察されなかつ

たことから、VRK1 のキナーゼ活性特異的であることが示された (図 4-1)。

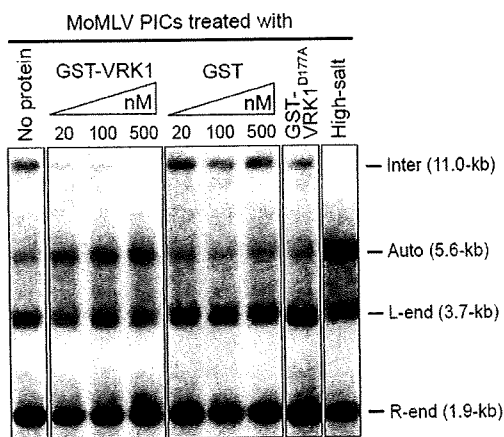


図 4-1. VRK1 によるインテグレーション活性の抑制. MoMLV PIC と GST-VRK1 をインキュベーションし、*in vitro* integration activity assay をおこなった。インテグレーションされたウイルス DNA を識別するために、DNA サンプルは *Bam*HI で消化し、LTR 配列に対するプローブを用いたサザンブロット法で検出した。インテグレーションされたウイルス DNA (11 kb) は Inter によって示されている。

VRK には VRK1 を含む 3 種類のファミリー蛋白質が存在する (VRK1, VRK2 ならびに VRK3)。これらを GST 融合蛋白質として作製し、MoMLV PIC に加えることによって、VRK1 同様に VRK2 や VRK3 もインテグレーション活性阻害効果をもつのか否かを検討した。その結果、GST-VRK2 は PIC 機能を阻害したが、GST-VRK3 処理ではインテグレーション活性の抑制は観察されなかった (図 4-2)。

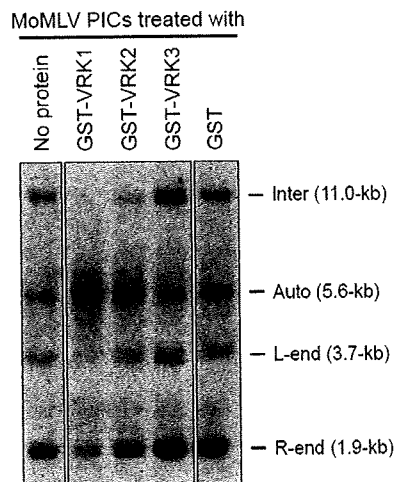


図 4-2. VRK ファミリー蛋白質の PIC インテグレーション活性に対する影響。

最後に、VRK1 が HIV-1 PIC に対しても阻害活性をもつかどうかを調べた。本研究で確立した HIV-1 PIC の試験管内活性評価システムを用い、ヒト由来の GST-VRK1 を作製して、VRK1 添加後のインテグレーション活性の変化をみたところ、VRK1 は HIV-1 PIC のインテグレーション活性も抑制できることが明らかとなった (図 4-3)。

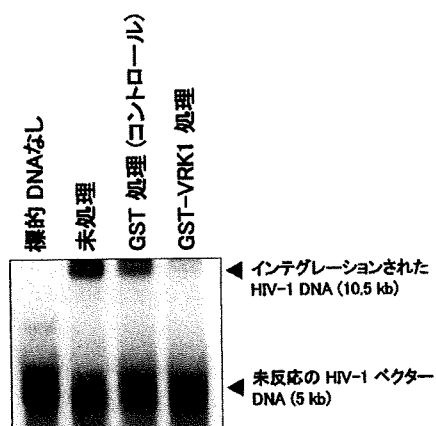


図 4-3. ヒト VRK1 による HIV-1 PIC インテグレーション活性の阻害. HIV-1 感染細胞から抽出した PIC にヒト由来の GST-VRK1 を処理し、*in vitro* integration activity assay をおこなった。

## 5. HIV-1 インテグラーゼ結合性因子 Huwe1 の同定と解析

インテグラーゼ (IN) は PIC 機能の中心を担う最も重要なウイルス性構成蛋白質である。本研究では HIV-1 IN に相互作用する細胞性因子の同定もおこなった。すでに研究代表者は 2 種類のタンデムタグ配列をもつ MoMLV IN を用いたタンデムアフィニティ精製法 (TAP 法) によって、Sqrd1、tubulin そして Huwe1 が MoMLV IN の細胞性結合因子であることを明らかにしている。共免疫沈降実験によって、Huwe1 は HIV-1 IN にも結合することが示された (図 5-1)。

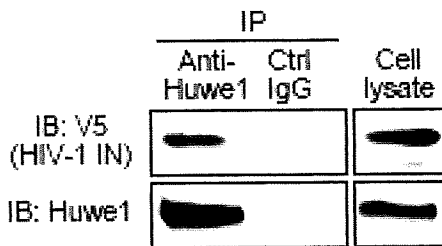


図 5-1. HIV-1 IN と Huwe1 の結合. V5 タグ融合 HIV-1 IN を 293T 細胞に発現させ、抗 Huwe1 抗体で共免疫沈降実験 (IP) をおこなった。免疫沈降されたサンプルにおける HIV-1 IN ならびに Huwe1 は、それぞれ抗 V5 抗体および抗 Huwe1 抗体を用いたイムブロットティング法 (IB) によって検出した。

つぎに、Huwe1 の HIV-1 感染における役割を解析する目的で内在性 Huwe1 をノックダウンした T 細胞株 (MT-4 細胞) を樹立した (図 5-2)。この Huwe1 ノックダウン細胞にルシフェラーゼをもつ HIV-1 ベクター (HIV-Luc) を感染させ、感染細胞におけるルシフェラーゼ活性をコントロール細胞におけるそれと比較したが、ルシフェラーゼ遺伝子の発現に差異はみられなかった (図 5-2)。このことは、Huwe1 は HIV-1 複製におけるインテグレーションならびに遺伝子発現までの過程に影響を及ぼさないことを示している。

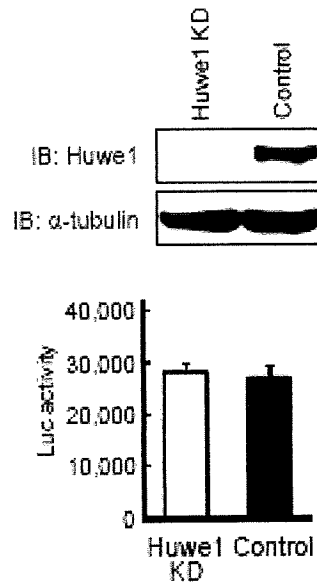


図 5-2. Huwe1 ノックダウン細胞に対する HIV-1 ベクターの感染性. インビトロジェン社の BLOCK-iT miR RNAi システムを用いて、内在性 Huwe1 をノックダウンした MT-4 細胞株を樹立した (上のパネル)。この細胞株、ならびに RNAi コントロール細胞株に HIV-Luc を感染させ、感染 48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した (下のパネル)。

一方、Huwe1 ノックダウン細胞に複製可能な HIV-1 NL4-3 株を感染させ、感染細胞から放出されてきたウイルスの感染価をコントロール細胞由来のものと比べたところ、Huwe1 ノックダウン細胞由来の HIV-1 は TZM-bl 細胞に対する感染性が有意に高まっていることが示された (図 5-3)。

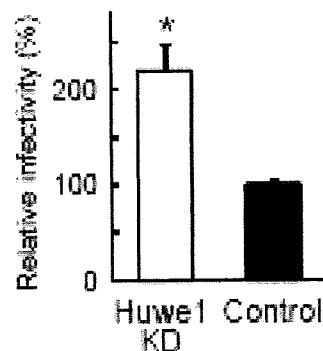


図 5-3. Huwe1 ノックダウン細胞から歩産生された HIV-1 の感染性. Huwe1 ノックダウン細胞もしくはコントロール細胞に HIV-1



NL4-3 株を感染させ、3 日後の培養上清を回収した。このウイルスを含む培養上清を TZM-bl 細胞に添加し、48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定することで感染性 (Relative infectivity) を比較した。

また、MT-4 細胞を標的細胞として用いた場合、Huwei1 ノックダウン細胞由来のウイルスは逆転写反応の効率が高まっていた (図 5-4)。

これらの結果より、Huwei1 が HIV-1 感染におけるウイルス粒子形成の段階に関与する可能性が示唆されたため、感染性ウイルスの形成に必須な Gag-Pol 前駆体蛋白質と Huwei1 の相互作用を解析した。そして、Huwei1 は実際に Gag-Pol 会合し、その結合は IN 領域に依存的であった (図 5-5)。以上の結果はレトロウイルス IN 結合性因子として同定された Huwei1 が Gag-Pol 前駆体蛋白質にも相互作用し、何らかの機構によって感染性 HIV-1 粒子の形成を負に制御する可能性を示唆するものである。

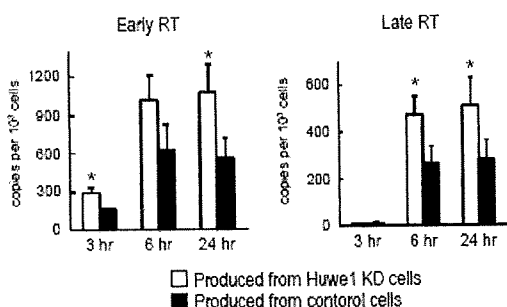


図 5-4. Huwei1 ノックダウン細胞由来 HIV-1 の標的細胞内における逆転写反応効率。Huwei1 ノックダウン細胞もしくはコントロール細胞由来の HIV-1 NL4-3 株を MT-4 細胞に感染させ、3、6 ならびに 24 時間後の初期 (Early RT) および後期 (Late RT) 逆転写反応産物をリアルタイム PCR にて定量した。

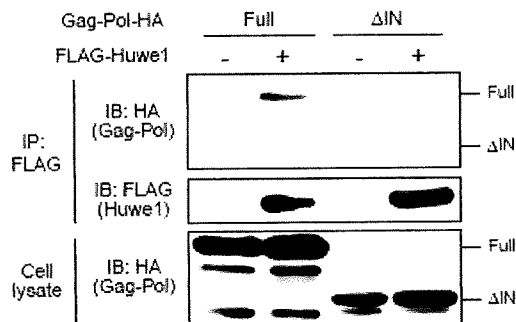


図 5-5. Huwei1 と HIV-1 Gag-Pol 前駆体蛋白質の相互作用。HA タグを融合した HIV-1 Gag-Pol と FLAG タグ融合 Huwei1 を 293T 細胞に発現させ、FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験 (IP) をおこなった。免疫沈降サンプルにおける Gag-Pol と Huwei1 はそれぞれ抗 HA 抗体ならびに抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロットティング法 (IB) によって検出した。

#### D. 考察

HAART 療法はエイズ発症の遅延と HIV 感染者の余命の大幅な延長を実現した。一方で、化学薬剤を長期間服用することによる感染者への肉体的負担や、耐性ウイルスの出現が課題として残されている。したがって、既存の化学薬剤療法と併用可能な新しいエイズ治療戦略の道筋を見出す上で、細胞が本質的にもつウイルス制御機構の解析は必要不可欠である。本研究では、ウイルス DNA の染色体への組み込み (インテグレーション) を実行する高分子複合体 (PIC) に着目し、その機能を制御する細胞性因子の解析をおこなった。

インテグレーション反応は、精製した組換え体 IN だけを用いても試験管内で再現することができる。しかし、その効率は極めて低く、反応自体も不完全である。一方、ウイルス感染細胞から抽出した PIC を用いると、完全なインテグレーション反応を効率よく再現できることが知られている。このことから、PIC には IN の機能を促進する何らかの因子 (co-factor) が存在するのではないかと考えられてきた。この因子のひとつとして BAF が報告されている。BAF は HIV-1 などのレトロウイルス PIC に直接結合し、その DNA 結合活性によってウイルス DNA の保護、そして標的 DNA への架橋を担うと考えられている。また、BAF は細

胞分裂周期依存的にリン酸化されるが、最近、BAFのリン酸化を触媒する細胞性キナーゼとしてVRKが同定された。興味深いことに、VRKが触媒するリン酸化によってBAFはDNAへの結合活性を失う。本研究ではこの機能に着目して、VRKのPICに対する影響を解析した。その結果、VRK1はPICからBAFを解離でき、それによってPICはそのインテグレーション活性を失うことが示された。重要なことには、VRK1のインテグレーション抑制活性はHIV-1 PICに対しても有効であった。これまでにHIV-1 PICのインテグレーション機能を抑えるような宿主因子は報告されていない。従って、本研究の結果は、細胞が本質的にもつインテグレーション制御因子(VRK)の存在を示した初めての知見である。

PICに対するVRKの作用を解析するにあたり、本研究ではHIV-1由来PICの抽出ならびに解析方法の確立もおこなった。研究代表者はこれまでにMoMLVをレトロウイルスのモデルとして用い、PICの解析をおこなってきたが、MoMLVに比べるとHIV-1はその細胞障害性などでPIC抽出に必要な高感染価のウイルスを用いることが難しい。しかし、HIV-1ベクターをHeLa細胞にMOI=10程度で感染させることによって、高いインテグレーション活性を維持したHIV-1 PICの抽出が可能となった。従来のIN阻害剤の開発は、組換え体INとウイルスDNAの配列を模した基質DNAを用いた*in vitro* integration assayによって主におこなわれてきた。しかし、前述のように、IN蛋白質のみで再現できるインテグレーション反応には限界があるが、PICを用いることによって感染細胞内でみられるインテグレーションをより忠実に再現することができる。したがって、PICを用いた試験管内HIV-1インテグレーション評価システムは、今後も開発が進むと思われるIN阻害剤の新規スクリーニングにおいて極めて有効な手法であると考えられる。

細胞性制御因子VRKについて、今年度は主に*in vitro*解析によってその抑制メカニズムを明らかにした。今後は培養細胞レベル

での効果を検討していくことが必要であろう。

また本研究ではPICのインテグレーション活性を担うINについても着目し、その細胞性相互作用因子の解析をおこなった。MoMLV INの新規結合蛋白質として同定されたHuwelはHIV-1 INにも結合することが明らかとなったが、内在性Huwelをノックダウンした細胞に対する感染実験の結果では、HIV-1のインテグレーションまでの過程には変化はみられなかった。しかし、HuwelのノックダウンによってHIV-1の感染性は有意に高まることから、Huwelは何らかの機序で感染性ウイルス粒子の形成を負に制御する可能性が考えられる。実際にHuwelはINだけでなく、その前駆体蛋白質であるGag-PolにもIN領域依存的に相互作用した。このことは、IN結合性因子として同定された細胞性因子がインテグレーション以外の過程に影響を及ぼすという意味で、興味深い結果である。INをコードする遺伝子領域に変異を導入したHIV-1の解析によって、INが逆転写反応やウイルス粒子形成といったインテグレーション以外の過程に関与することがよく知られている。この現象は“INの多面的作用(pleiotropic effects)”とよばれるが、本研究の結果は、このpleiotropic effectsに到る分子機序を細胞性因子の側から説明するものである。HuwelはGag-Pol前駆体蛋白質に相互作用することによって、Gag-Polの細胞内局在やプロセッシング効率に影響を与え、その結果HIV-1粒子の感染性を変化させることが予想される。今後は感染性ウイルス粒子形成の制御に到る分子メカニズムをさらに解析していかなければならないが、その作用機構を解明することは、Gag-PolのIN領域を標的とする新しい抗HIV-1剤を開発する一助になると思われる。

## E. 結論

インテグレーション反応のプラットフォームとなるヌクレオプロテイン複合体(PIC)の機能を制御する細胞性因子の解析をおこなった。HIV-1やMoMLV PICの細胞性構成因子であるBAFはPICのインテグレ

ーション活性を促進する働きをもつ。本研究では BAF を PIC から解離し、結果的に PIC 機能の低下をもたらす細胞性キナーゼ VRK1 の同定に到った。VRK1 は BAF のリン酸化を触媒することで、BAF の DNA 結合活性を低下させ、PIC のウイルス DNA から BAF を解離させることが示された。また、VRK1 だけでなくそのファミリー蛋白質である VRK2 も同様の阻害活性をもつことが明らかとなった。そして、ヒトの VRK1 を用いた場合には、HIV-1 PIC のインテグレーション活性の抑制がみられた。

また、HIV-1 IN に相互作用する細胞性因子として Huw1 を見出した。内在性 Huw1 をノックダウンした T 細胞株を用いた感染実験より、Huw1 はインテグレーションの過程には影響を及ぼさないものの、感染細胞から産生される HIV-1 粒子の感染性を負に制御することが示された。実際に Huw1 は IN の前駆体蛋白質である Gag-Pol にも相互作用した。これらの結果は IN 結合性因子がインテグレーション以外の過程に関与する可能性を示唆しており、大変興味深い。

平成 21 年度は、インテグレーション複合体もしくは IN に関連する HIV-1 制御因子の存在とその制御メカニズムを明らかにした。本研究の結果は、既存の化学療法の効果を高める新たな治療戦略を確立する上で、極めて重要な情報をもたらすものと思われる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Shinoda, Y., Hieda, K., Koyanagi, Y., and Suzuki, Y. Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector. *Virus Genes* 39: 165-175, 2009.

2) 鈴木康嗣、鈴木陽一. HIV の病原性と細胞内防御機構. *日本臨牀* 68: 415-421, 2010.

## 2. 学会発表

1) Suzuki, Y. Disruption of retroviral integration complex by a cellular kinase. The 16th East Asia Joint Conference on Biomedical Research. September 13-14, 2009, Kyoto, Japan.

2) 鈴木陽一、山元誠司、大川克也、増田貴夫、森山裕子、小柳義夫. レトロウイルスインテグラーゼ結合性因子 Huw1 の同定と HIV-1 感染における役割. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25~27 日、東京.

3) 渡部匡史、鈴木陽一、宮澤正顯、小柳義夫. Rho GTPase family による HIV-1 複製抑制. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25~27 日、東京.

4) 鈴木康嗣、小川加那子、小柳義夫、鈴木陽一. レトロウイルスゲノムの組み込み機能を阻害する細胞性キナーゼの同定とその作用機序の解析. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25~27 日、東京.

5) 鈴木陽一. 細胞性因子によるレトロウイルスのゲノム組み込み機構の制御 - エイズウイルスの制圧に向けて-. 中高温微生物センター開所記念シンポジウム. 2009 年 11 月 19 日、山口.

6) 鈴木陽一. インテグレーションの分子メカニズムと細胞性因子 - 新しい阻害剤の開発に向けて. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2009 年 11 月 26~28 日、名古屋.

7) 山元誠司、大川克也、増田貴夫、森山裕子、小柳義夫、鈴木陽一. HIV-1 インテグラーゼ相互作用因子 Huw1 による HIV-1 の感染抑制. 第 23 回日本エイズ学会学術集会・総会. 2009 年 11 月 26~28 日、名古屋.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shinoda, Y. Hieda, K., Koyanagi, Y., <u>Suzuki, Y.</u>	Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector	<i>Virus Genes</i>	39 巻	165-175	2009

## Efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV-1 genes by a gene-regulatable lentiviral vector

Yasuhiko Shinoda · Kuniko Hieda ·  
Yoshio Koyanagi · Youichi Suzuki

Received: 18 April 2009 / Accepted: 12 June 2009 / Published online: 25 June 2009  
© Springer Science+Business Media, LLC 2009

**Abstract** Lentiviral vectors modified from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) offer a promising approach for gene therapy, facilitating transduction of genes into non-dividing cells both in vitro and in vivo. When transducing cytotoxic or anti-HIV genes, however, the vector must avoid self-inhibition by the transgene that can lead to a disruption in production of infectious virions. In this study, we constructed two HIV-1-based lentiviral vectors harboring the mifepristone-inducible gene expression unit in either the forward or the reverse orientation with respect to the direction of viral genomic RNA. The ability of these vectors to transduce cytotoxic and anti-HIV genes was evaluated. When human CD14 was used as a transgene, infectious lentiviral vectors were produced by both forward and reverse vector systems. CD14 expression was efficiently induced in cells transduced by both lentiviral vectors following treatment with mifepristone. However, a higher level of basal transgene expression was observed in the forward vector system in the absence of mifepristone. In contrast, high titers of infectious lentiviral vector containing the cytotoxic *vesicular stomatitis virus M*

gene were successfully generated using the reverse vector, but not the forward vector. In addition, when a VPS4B-dominant negative mutant against HIV-1 budding was cloned into the reverse vector, significant amounts of lentiviral vector were obtained. Subsequent transduction of cells with the VPS4B mutant resulted in approximately 50% inhibition of HIV-1 production only in the presence of mifepristone. Our study thus demonstrates that incorporation of a mifepristone-regulatable gene expression unit in the reverse orientation makes significant advances toward development of a lentiviral vector that allows transduction of harmful genes.

**Keywords** Lentiviral vector · Mifepristone-regulatable system · VSV M · VPS4B

### Introduction

A variety of gene-transfer vectors based on RNA and DNA viruses have been developed to deliver foreign genes to target cells in vitro and in vivo [1]. Retroviral vectors derived from gammaretroviruses and lentiviruses have the potential advantage of sustained expression of transgenes in transduced cells, because of their ability to stably integrate viral DNA into the host genome. While gammaretroviruses require cell division to establish infections, lentiviruses including human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) are capable of infecting both dividing and non-dividing cells [1]. Lentivirus-based vector systems thus potentiate long-term gene expression in non-dividing cells such as neurons and hematopoietic stem cells [2, 3].

Lentiviral vectors hold great promise for a gene therapy approach to inherited and acquired diseases such as cancer and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

---

Y. Shinoda · K. Hieda · Y. Koyanagi  
Laboratory of Viral Pathogenesis, Research Center for AIDS,  
Institute for Virus Research, Kyoto University, Kyoto 606-8507,  
Japan

Y. Suzuki (✉)  
Laboratory for Host Factors, Center for Emerging Virus  
Research, Institute for Virus Research, Kyoto University,  
53 Shogoin-Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan  
e-mail: ysuzuki@virus.kyoto-u.ac.jp

**Present Address:**  
K. Hieda  
Microbiological Research Institute, Otsuka Pharmaceutical Co.,  
Ltd, Kawauchi-cho, Tokushima 771-0192, Japan

A potential application of lentiviral vectors would be the transduction of a gene cytotoxic to tumor cells or virus-infected cells resulting in the eradication of these unwanted cells from the body. For the treatment of AIDS, an alternative approach would be to deliver an anti-HIV gene to a population of cells rendering them resistant to HIV infection. However, insertion of toxic or anti-HIV genes into an HIV-based lentiviral vector can create problems for production of the vector itself. Expression of anti-HIV transgenes in vector packaging cells can interfere with production of lentivirus particles, blocking the ability to make lentiviral vector [4]. One strategy to solve this problem is the use of a regulatable system in which the target transgene is kept silent during vector production and expression is subsequently switched on following transduction in the context of a lentiviral vector.

The first generation of regulatable gene expression systems was based on naturally occurring inducible promoters [5]. However, this type of system had limitations due to high levels of “leaky” or basal expression driven by such promoters, modest induction of transgene expression, and pleiotropic activity of the inducer. For these reasons, the last two decades have seen development of chimeric regulatable systems engineered from a number of prokaryotic, eukaryotic, and viral elements designed to enhance specificity and activity of transgene expression [6]. Amongst the reported chimeric regulators is one based on a mutated human progesterone receptor which is unable to bind endogenous hormone but is activated by binding the progesterone antagonist, mifepristone (RU-486) [7, 8]. The chimeric transactivator (regulator) protein of this so-called GeneSwitch system comprises the GAL4 DNA-binding domain from *Saccharomyces cerevisiae* fused to the ligand-binding domain of a mutant progesterone receptor and the activation domain of the p65 subunit of human NF- $\kappa$ B [8]. In the presence of mifepristone, this transactivator binds to GAL4 activation sequences upstream of the inducible transgene, stimulating transcription of the target gene by more than 200-fold in cultured cells [9]. An advantage of the GeneSwitch system is that the majority of its components are modified human proteins having no impact on cell viability. In addition, although mifepristone has anti-progesterone and -glucocorticoid activities, the concentration needed for ligand-inducible transactivation of the target gene ( $10^{-8}$  to  $10^{-11}$  M) is much lower than the concentration producing an anti-progesterone effect in humans [10]. Furthermore, use of a mifepristone-inducible (autoinducible) promoter to regulate expression of the chimeric transactivator dramatically reduced basal expression of the transgene in the absence of the inducer, thereby improving the dynamic range of in vivo transgene regulation [9].

Many types of regulatable gene expression systems have been incorporated into lentiviral vectors [11–21]. The most commonly used inducible system is based on the bacterial tetracycline-responsible gene expression system (Tet system) [22]. While representing an important tool for controlling target gene expression, Tet-regulatable systems in the context of lentiviral vectors have shown high basal levels of transgene expression without induction [22]. Such leakiness would be undesirable especially in the production of lentiviral vectors aimed at transducing toxic proteins into target cells.

To generate a viral vector in which transgene expression was tightly controlled, we combined an HIV-1-based lentiviral vector with the GeneSwitch system described above. The mifepristone-inducible lentiviral vector reported here minimized the interference of transgene expression during virus production and permitted efficient transduction of cytotoxic and anti-HIV genes into target cells.

## Materials and methods

### Cells

GeneSwitch-293 cells (a HEK293-derived human cell line expressing the GeneSwitch protein) were purchased from Invitrogen. GeneSwitch-293 and human 293T cells were maintained in Dulbecco’s modified Eagle medium (D-MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS), 100 units/ml of penicillin, and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin (D-MEM/10% FCS).

### Construction of lentiviral vector plasmids

The mifepristone-inducible promoter sequence, GAL4/TATA, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the vector pGene/V5-His5C (Invitrogen) and subcloned into LITMUS28 (New England Biolabs) to create pLITMUS28-GAL4/TATA. A GAL4/TATA fragment was then inserted into a Gateway-compatible lentiviral vector plasmid pYK005C [23] producing the plasmid for the forward vector (fragment positioned in the forward orientation).

To generate a plasmid for the reverse vector, a fragment containing the Gateway cloning cassette, internal ribosome entry site (IRES), and humanized *Renilla* green fluorescent protein (hrGFP) sequences together with a fragment containing bovine growth factor hormone poly(A) (BGH pA) sequence were isolated from pYK005C and pSwitch (Invitrogen), respectively. These were subcloned into LITMUS28. Then, the GAL4/TATA sequence derived from pLITMUS28-GAL4/TATA was inserted into the subcloning plasmid. To prepare a vector backbone, the internal human

elongation factor 1  $\alpha$  subunit promoter of a self-inactivating (SIN) lentiviral vector plasmid, CSII-EF-MCS [24], was replaced with a fragment containing GAL4/TATA, Gateway-cassette, IRES, hrGFP, and BGH pA sequences, thus generating the final plasmid.

Preparation of all Gateway plasmids containing the *ccdB* gene was carried out using *Escherichia Coli* (*E. Coli*) strain DB3.1.

#### Cloning of transgenes

All transgenes were cloned into the lentiviral vector plasmid via the Gateway cloning system [23]. Entry plasmid clones encoding transgenes were constructed as follows. Human CD14 was amplified by PCR using primers containing the *attB1* tail (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3') at the 5'-end of the forward primer and the *attB2* tail (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3') at the 5'-end of the reverse primer [23]. PCR products were subcloned into the entry plasmid, pDONR201 (Invitrogen), using a Gateway BP reaction [23]. Vesicular stomatitis virus matrix protein (VSV M) cDNA fused with a FLAG epitope tag sequence (FLAG-VSV-M) was generated from a VSV M-expressing plasmid, pEGFPN3-M [25]. This involved use of a forward primer containing the *attB1* tail and subsequent FLAG tag sequence (5'-ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAG-3') and a reverse primer containing the *attB2* tail. The PCR fragment encoding FLAG-VSV-M was subcloned into entry plasmid, pDONR221 (Invitrogen), by Gateway BP reaction. Fragments encoding the VPS4B K180Q mutant (VPS4B-KQ) or firefly luciferase (Luc) were amplified by PCR from VPS4B K180Q-expressing plasmid [26] and pGL3-Basic (Promega), respectively. These fragments were inserted into *EcoRI-MluI* sites downstream of three FLAG epitope tags in pCMV-SPORT6-3xFLAG, a Gateway-compatible pCMV-SPORT6 (Invitrogen)-derived entry plasmid. After sequence confirmation, individual transgenes in entry plasmids were transferred to lentiviral vector plasmids by Gateway LR reaction.

#### Lentiviral vector production

293T cells were seeded to appropriate densities 20 h prior to transfection. Infectious lentiviral vectors pseudotyped with VSV G protein were produced by lentiviral vector plasmid, VSV G- and HIV-1 Rev-expressing plasmid (pCMV-VSV-G-RSV-Rev), and HIV-1 Gag-Pol-expressing plasmid (pCAG-HIVgp) via calcium phosphate-mediated transfection, as described previously [27]. Conditioned medium was harvested 48-h post-transfection and concentrated 40-fold by ultracentrifugation at 4°C at 100,000 $\times g$  for 90 min.

For titration of the lentiviral vectors, GeneSwitch-293 cells were infected with serial dilutions of vector stocks supplemented with 10 nM mifepristone (Invitrogen) 24-h post-infection. Vector titers (transduction units; TU) were determined 48 h after induction by quantitative flow cytometric analysis for hrGFP positive cells.

In the following text, the use of “p” and “v” to prefix nomenclature denotes vector plasmid and infectious lentiviral vector, respectively.

#### Transduction and induction of transgenes

GeneSwitch-293 cells were seeded in 6-well plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well with D-MEM/10% FCS 20 h prior to infection. Cells were then exposed to lentiviral vectors for 24 h at multiplicities of infection (MOI) of 0.1 (for vF-CD14 and vR-CD14) or 5 (for vR-VSV-M). To induce transgene expression, culture medium was replaced with D-MEM/10% FCS containing 10 nM mifepristone and cells were analyzed 48 h (vF-CD14 and vR-CD14 transductions) or 24 h (for vR-VSV-M transduction) later.

#### Flow cytometric analysis

Transduced cells were incubated with anti-human CD14 mouse monoclonal antibody (61D3, eBioscience) for 20 min at 4°C and then stained with Cy5-conjugated anti-mouse IgG donkey polyclonal antibody (Chemicon International Inc.) for a further 20 min at 4°C. Data were collected using the FACScalibur system (BD Bioscience) and analyzed with WinMDI software.

#### Western blotting analysis

Cells were lysed in SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% glycerol, 0.003% bromophenol blue, 0.9%  $\beta$ -mercaptoethanol). Boiled samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to Immobilon Transfer Membranes (Millipore). Primary antibodies used were (i) anti-FLAG mouse monoclonal IgG (M2, Sigma) to detect FLAG-VSV-M; (ii) biotinylated anti-FLAG mouse monoclonal IgG (BioM2, Sigma) to detect FLAG-VPS4B-KQ and FLAG-Luc; and (iii) anti- $\alpha$ -tubulin mouse monoclonal IgG (DM1A, Sigma) to detect  $\alpha$ -tubulin. Biotinylated anti-mouse IgG (BA-2000, Vector Laboratories) was then used for the detection of FLAG-VSV-M. Proteins were detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin (ZYMED Laboratories, for FLAG-tagged proteins) and HRP-conjugated anti-mouse IgG (Cell Signaling, for  $\alpha$ -tubulin) using a Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus

(PerkinElmer). Signals were analyzed using a luminescence image analyzer, LAS-3000mini (Fujifilm).

### Microscopy analysis

293T cells transfected with pF-VSV-M and pR-VSV-M were examined by light and fluorescent microscopy using an Eclipse TS100 microscope (Nikon) at the point of harvesting lentiviral vector. Images were obtained with a DFC480 digital camera and IM500 image manager software (Leica Microsystems).

To detect FLAG-VSV-M, transduced cells were fixed with 4% paraformaldehyde and incubated with PBS containing 5% normal goat serum and 0.05% Triton X-100 at room temperature for 1 h. This was followed by incubation with anti-FLAG-mouse monoclonal IgG (M2) at 4°C overnight. Samples were then incubated with Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG (Invitrogen) at room temperature for 1 h and nuclei were stained using Hoechst 33342 (Invitrogen). Images were obtained using a CTR 6500 fluorescent microscope and FW4000 software (Leica Microsystems).

### Assay for HIV-1 release from VPS4B mutant-transduced cells

GeneSwitch-293 cells were seeded at a density of  $1 \times 10^3$  cells/well in a 96-well plate 20 h prior to infection and exposed to vR-VPS4B-KQ and vR-Luc at a MOI of 1 for 24 h. Transduced cells were then expanded for 4–5 weeks and reseeded at a density of  $4 \times 10^6$  cells in a 15-cm diameter dish 20 h prior to induction. A portion of transduced cells was subjected to flow cytometric analysis to monitor hrGFP expression after induction with 10 nM mifepristone. To enrich transduced cells, single hrGFP positive cells were positively selected using the FACSaria cell sorting system (BD Bioscience). Sorted cells were cultured for a further 4–5 weeks and cell clones with the strongest hrGFP signals in respective transductions were used for an assay of HIV-1 release.

For the assay of HIV-1 release, 4 µg of pNL4-3 [28] was transfected to transduced cells with Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Four hours post-transfection, culture medium was replaced with D-MEM/10% FCS containing 10 nM mifepristone. Culture supernatant was harvested 24 h later and virus production was monitored by HIV-1 p24<sup>CA</sup> enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, ZeptoMetrix).

### Statistical analysis

Student's *t* test was used to determine statistical significance. A *P* value of <0.05 was considered significant.

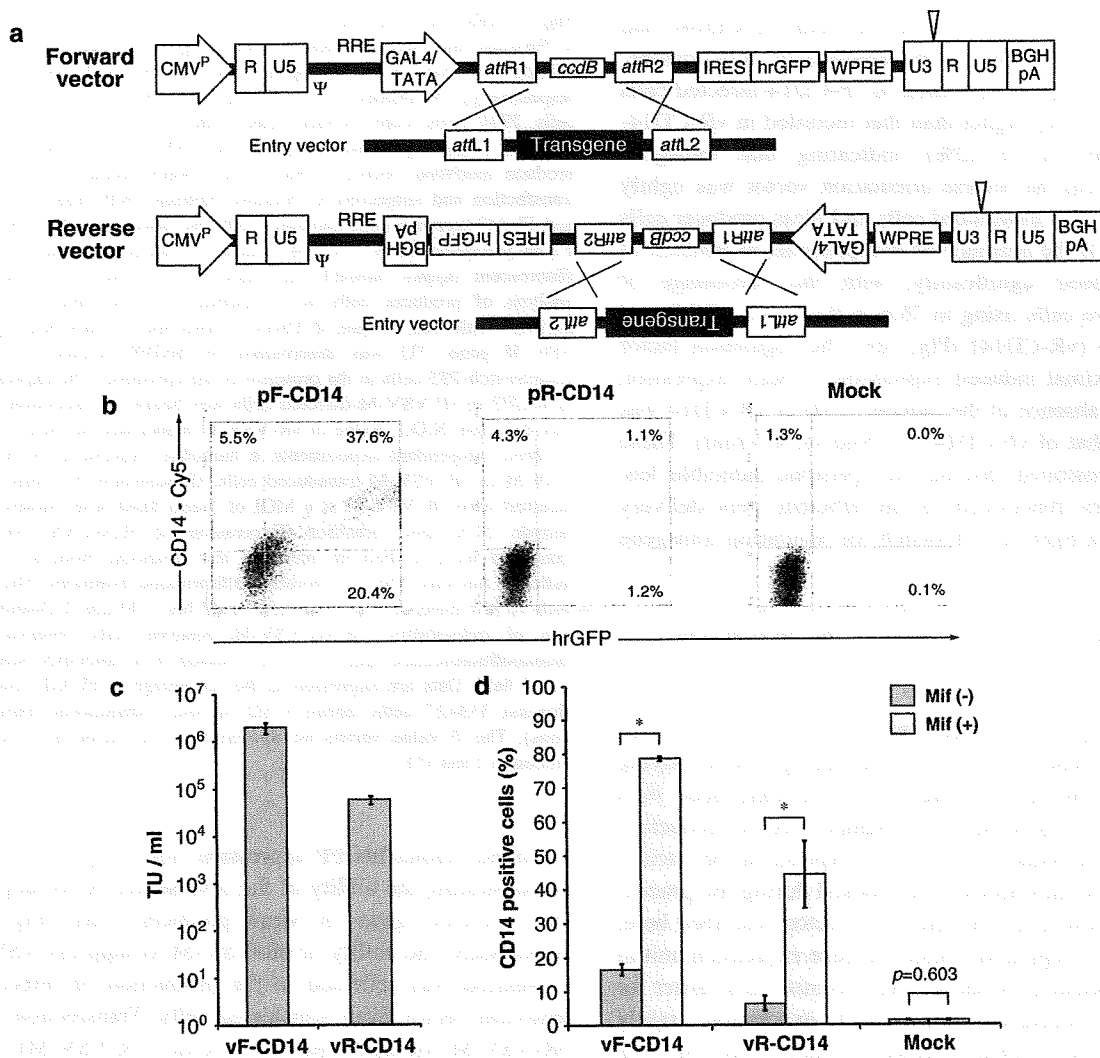
## Results

### Generation of mifepristone-inducible lentiviral vectors

To establish a regulatable viral vector system, we cloned a mifepristone-inducible promoter sequence (as an internal promoter) into a self-inactivating (SIN) lentiviral vector plasmid in which the U3 region of the 5'-long terminal repeat (LTR) was replaced with the cytomegalovirus (CMV) promoter and the enhancer/promoter unit was deleted from the U3 region of the 3'-LTR [23, 27]. The inducible promoter was a hybrid consisting of the yeast GAL4 upstream activating sequences linked to the adenovirus major late E1b TATA box (GAL4/TATA) [7]. Gene expression from the GAL4/TATA promoter was controlled by a chimeric regulatory protein termed GeneSwitch. Binding of mifepristone to GeneSwitch induced a conformational change in the regulator to an active state, resulting in transcription of the gene of interest [7]. Besides an inducible promoter, our lentiviral vectors contained a Gateway cloning system reading frame cassette, facilitating cloning of genes of interest by site-specific recombination-based Gateway technology [23]. In addition to a conventional lentiviral vector containing the GAL4/TATA-Gateway component in the forward orientation (forward vector, Fig. 1a), we also constructed a version of the lentiviral vector plasmid in which the inducible gene expression unit was located in the reverse orientation, with the intention of reducing interference from the CMV promoter (reverse vector, Fig. 1a).

To evaluate our gene delivery system, the human *CD14* gene was cloned into both forward and reverse vector plasmids (designated pF-CD14 and pR-CD14, respectively). Infectious lentiviral vectors (vF-CD14 and vR-CD14) were produced following co-transfection of VSV G/Rev-expressing plasmid and Gag-Pol-expressing plasmid into 293T cells. Flow cytometric analysis of transfected cells showed that even in the absence of the GeneSwitch protein and mifepristone, expression of *CD14* and cistronic *hrGFP* genes occurred in pF-CD14-transfected producer cells ( $40.7 \pm 3.1\%$ ), while such expression was repressed in pR-CD14-transfected cells ( $1.4 \pm 0.4\%$ ) (Fig. 1b). This leaky expression of transgenes from the forward vector plasmid in virus producer cells might be due to transcriptional interference arising from the presence of a heterologous promoter in the same orientation (i.e., the CMV promoter), which was required for Tat-independent transcription of the viral RNA genome [27]. Culture supernatant containing the lentiviral vector was harvested and viral titer determined by quantification of the number of hrGFP-positive cells in viral vector-transduced GeneSwitch-293 cells, expressing the GeneSwitch regulatory protein, in the presence of mifepristone [8]. Lentiviral vectors produced by pF-CD14 showed 34.4-fold higher





**Fig. 1** Transduction of the *CD14* gene by mifepristone-inducible lentiviral vectors. **a** Schematic of forward and reverse vectors. In these SIN lentiviral vector plasmids, the U3 region of the 5'-LTR has been replaced with the CMV promoter (CMV<sup>P</sup>) resulting in Tat-independent transcription. A portion of the U3 region containing the enhancer/promoter unit has been deleted from the 3'-LTR (represented as triangles). The gene of interest (transgene), flanked by *attB* sites, was subcloned into an entry plasmid and then transferred to the vector plasmid by a Gateway reaction. Note that site-specific recombination between *attR* sites on the vector plasmid and *attL* sites on the entry vector gave rise to new *attB* sites on the final lentiviral vector plasmid. The GAL4/TATA promoter regulated expression of the transgene and IRES-controlled hrGFP gene in the presence of the transactivator protein (GeneSwitch) and mifepristone. Ψ, packaging signal; RRE Rev responsive element; WPRE woodchuck post-regulatory element, BGH pA bovine growth factor hormone poly(A). **b** Expression of CD14 in vector producer cells. 293T cells were co-transfected with a VSV G/Rev-expressing plasmid, a Gag-Pol-expressing plasmid, and a forward or reverse

vector plasmid coding *CD14* and *hrGFP* genes (pF-CD14 and pR-CD14, respectively). Expression of CD14 (y-axis) and hrGFP (x-axis) at the time of vector harvest (48 h after transfection) was analyzed by flow cytometric analysis. Untransfected cells (mock) served as a negative control. The representative results of three independent experiments are shown. **c** Infectious titers of lentiviral vectors. Vector titer (transducing units [TU]/ml) was determined by quantitative flow cytometric analysis for hrGFP positive cells on transduced GeneSwitch-293 cells in the presence of mifepristone. Values represent the mean ± standard deviation (SD) for triplicate determinations. **d** Transduction and induction activities of lentiviral vectors. GeneSwitch-293 cells were infected with vF-CD14 or R-CD14 at a MOI of 0.1 (or uninfected, mock) and cultivated in the presence or absence of 10 nM mifepristone (Mif (+) and Mif (-), respectively). Expression of CD14 protein 48 h after induction was determined by flow cytometric analysis. Values represent the mean ± SD of three independent experiments. The *P* value versus no mifepristone treatment is <0.05 by Student's *t* test (\*)

viral titers (vF-CD14,  $2.0 \pm 0.5 \times 10^6$  TU/ml) than viral vectors obtained by pR-CD14 (vR-CD14,  $5.8 \pm 1.1 \times 10^4$  TU/ml) (Fig. 1c). The transduction and induction

efficiencies of lentiviral vectors were then assessed following infection of GeneSwitch-293 cells at a MOI of 0.1. As shown in Fig. 1d, a low level of CD14 expression in

transduced cells was observed in both vF-CD14- and vR-CD14-infected cells in the absence of mifepristone. However, basal gene expression in vF-CD14-infected cells ( $16.5 \pm 1.7\%$ ) was higher than that recorded in vR-CD14-infected cells ( $6.3 \pm 2.2\%$ ), indicating that transgene expression from the reverse orientation vector was tightly controlled in both transduced cells and virus producer cells (Fig. 1b, d). In the presence of mifepristone, expression of CD14 increased significantly, with the percentage of CD14-positive cells rising to  $78.6 \pm 0.6\%$  (vF-CD14) and  $44.3 \pm 9.9\%$  (vR-CD14) (Fig. 1d). The regulation factor (ratio of maximal induced expression to basal expression levels in the absence of the inducer [29]) of vR-CD14 was higher than that of vF-CD14 (7.0-fold vs. 4.7-fold). These results demonstrated that our mifepristone-inducible lentiviral vectors functioned as an efficient gene-delivery system with a tight on–off switch for regulating transgene expression.

#### Transduction of a cytotoxic gene by the mifepristone-inducible lentiviral vector

In gene therapies for cancer patients, delivery of a cytotoxic gene by lentiviral vector is one strategy for destroying tumor cells. However, expression of a toxic gene in a lentiviral vector genome would hamper vector production resulting in a reduction in titer. Expression of such a cytotoxic gene thus needs to be blocked during the process of vector production. The lentiviral vector described here, containing a mifepristone-inducible gene expression unit in the reverse orientation, shows great promise as a carrier for a cytotoxic transgene with CD14 expression tightly repressed in pR-CD14-transfected producer cells (Fig. 1b). We examined this system further to ascertain if it could produce infectious lentiviral vector containing a cytotoxic gene and transduce that gene into target cells. Forward and reverse vector plasmids containing FLAG tag-fused VSV matrix protein (FLAG-VSV-M) were constructed (pF-VSV-M and pR-VSV-M, Fig. 2a) and transfected into 293T cells to produce VSV G-pseudotyped infectious vector. VSV M was chosen as it inhibits nuclear export of cellular RNA by interacting with nucleoporin. This protein is responsible for most of the cytopathic effects observed in VSV-infected cells [30]. Analysis of the level of FLAG-VSV-M in virus producer cells showed that, even in the absence of inducers, transgene expression was activated in pF-VSV-M-transfected cells, while expression was undetectable in pR-VSV-M-transfected cells (Fig. 2b). As predicted by Western blotting analysis, activated expression of the downstream *hrGFP* cistron, together with the rounded phenotype of infected cells (a hallmark of VSV infection in cell culture [30]), was observed in pF-VSV-M-transfected cells (Fig. 2c). In contrast, pR-VSV-M-transfected cells

**Fig. 2** Effective transduction of VSV M by the reverse vector. **a** Forward and reverse vectors containing FLAG-tagged VSV M (FLAG-VSV-M) as a transgene (pF-VSV-M and pR-VSV-M, respectively). **b** Expression of FLAG-VSV-M in vector producer cells. 293T cells were co-transfected with a VSV G/Rev-expressing plasmid, a packaging plasmid, and pF-VSV-M or pR-VSV-M to produce lentiviral vectors. Cell extracts were prepared 48 h after transfection and subjected to Western blotting (WB) analysis using anti-FLAG (*upper panel*) and anti- $\alpha$ -tubulin (*lower panel*) antibodies. **c** Leaky expression of VSV M caused the death of producer cells. Fluorescent (*upper panels*) and light (*lower panels*) microscopic analysis of producer cells was undertaken at the time of vector harvest. Scale bar, 40  $\mu$ m. **d** Titers of lentiviral vectors bearing the VSV M gene. TU was determined by hrGFP positive cells in GeneSwitch-293 cells in the presence of mifepristone. The expression of hrGFP in vF-VSV-M-infected cells was below the detection limit (not detected, N.D.). Value of vR-VSV-M represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. **e** Inducible expression of FLAG-VSV-M in vR-VSV-M-transduced cells. GeneSwitch-293 cells were infected with vR-VSV-M at a MOI of 5 and fixed with paraformaldehyde 24 h after induction. Expression of FLAG-VSV-M was examined as described in materials and methods. Hoechst 33342 indicates nucleus. Mif (–), without mifepristone treatment; Mif (+), with 10 nM mifepristone treatment; scale bar, 100  $\mu$ m. **f** Quantification of inducibility. FLAG-VSV-M positive cells observed by immunofluorescence analysis were counted in a randomly selected visual field. Data are expressed as the percentage of FLAG<sup>+</sup> cells in Hoechst 33342<sup>+</sup> cells (mean  $\pm$  SD of four independent transductions). The *P* value versus no mifepristone treatment is <0.05 by Student's *t* test (\*)

exhibited neither hrGFP expression nor cytopathic effect, demonstrating the ability of the reverse vector to suppress the cytotoxic gene in virus producer cells (Fig. 2c). Importantly, the ability of pR-VSV-M to suppress VSV M expression was reflected in the production of infectious lentiviral vector from transfected cells. Transfection with pR-VSV-M yielded lentiviral vector (vR-VSV-M) with titers of  $1.5 \pm 0.5 \times 10^4$  TU/ml, while no infectious vector could be obtained by transfection with pF-VSV-M (Fig. 2d). The ability of vR-VSV-M to transduce the transgene was then analyzed by infection of GeneSwitch-293 cells. Immunostaining analysis indicated that FLAG-VSV-M expression was induced in response to mifepristone in transduced cells (Fig. 2e) and the regulation factor (i.e., inducibility) was 11.8-fold (FLAG positive cells per Hoechst 33342 positive cells,  $4.6 \pm 3.2\%$  without mifepristone treatment versus  $54.5 \pm 20.6\%$  with mifepristone treatment (Fig. 2f). These data demonstrated that our reverse vector system is suitable for the transduction of a harmful gene.

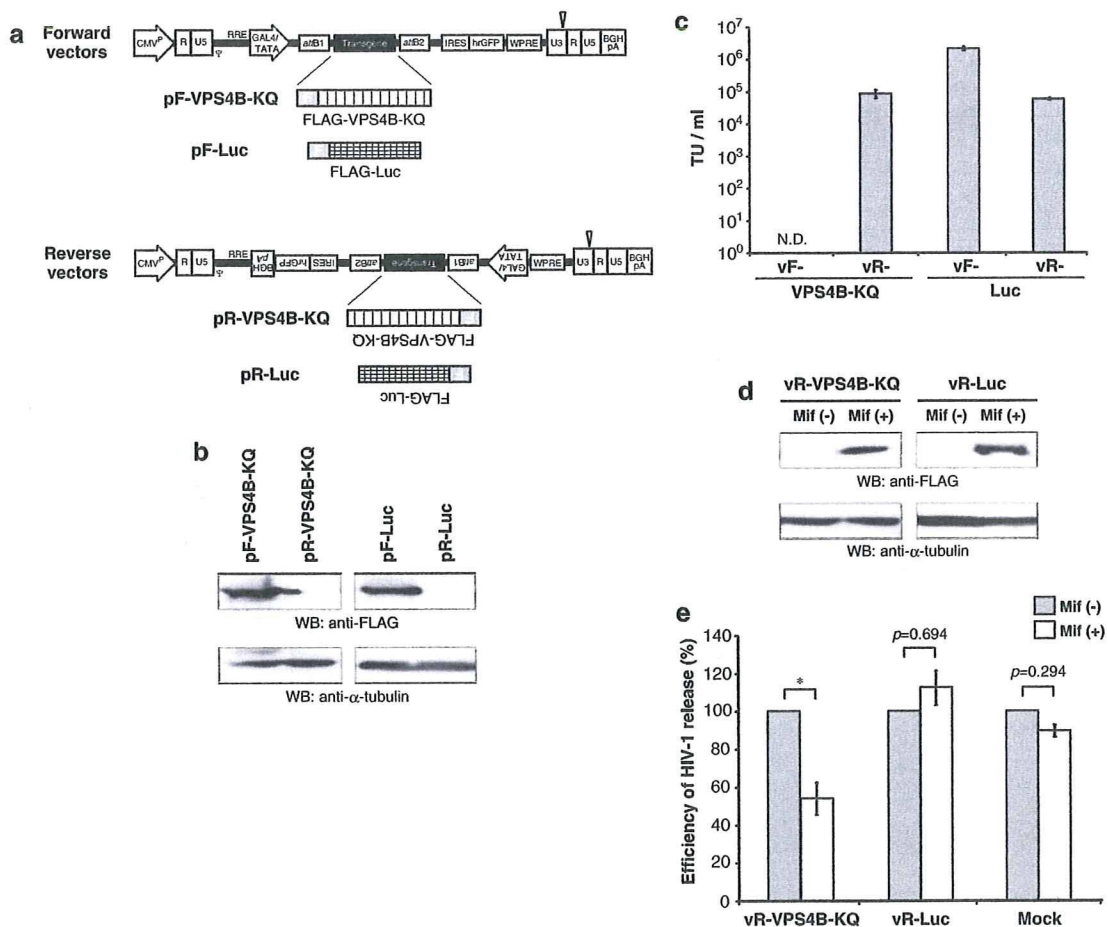
#### Inhibition of HIV-1 release by mifepristone-inducible lentiviral vector

To evaluate whether the reverse vector could overcome self-inhibition caused by an anti-HIV transgene in producer cells, a dominant negative mutant of human VPS4B was



HIV-1 budding with dominant negative mutants of VPS4 (such as K180Q, where the residues required for ATP binding have been mutated), previously reported to block HIV-1 release and infectivity [26]. We inserted a FLAG tag-fused VPS4B K180Q mutant (FLAG-VPS4B-KQ) into both the forward and the reverse vector plasmids and constructed vector plasmids encoding FLAG tag-fused luciferase (FLAG-Luc) as control vectors (Fig. 3a). When these vector plasmids were used to produce lentiviral vector, expression of the transgenes (i.e., FLAG-VPS4B-KQ or FLAG-Luc) was observed in producer cells

transfected with forward vector plasmids, but not in cells with reverse vector plasmids (Fig. 3b). While transfection with pR-VPS4B-KQ yielded infectious lentiviral vector, vR-VPS4B-KQ, transfection with pF-VPS4B-KQ did not generate infectious vector, indicating that leaky expression of the VPS4 dominant negative mutant from the forward vector plasmid self-inhibited lentiviral vector production (Fig. 3c). Titers of vR-VPS4B-KQ ( $8.7 \pm 2.4 \times 10^4$  TU/ml) were comparable to those of lentiviral vector obtained by transfection with pR-Luc (vR-Luc,  $5.9 \pm 4.1 \times 10^4$  TU/ml), indicating that titers of lentiviral vectors containing the gene



**Fig. 3** Inhibition of HIV-1 release by a reverse vector encoding VPS4B dominant negative mutant. **a** Schematic representation of forward and reverse vectors bearing FLAG-tagged VPS4B K180Q (FLAG-VPS4B-KQ) or luciferase (FLAG-Luc). **b** Expression of transgenes in vector producer cells. The lentiviral vectors were produced as described in “Materials and methods”. Producer cells were collected at the time of virus harvest and subjected to Western blotting (WB) analysis using anti-FLAG (*upper panels*) and anti- $\alpha$ -tubulin (*lower panels*) antibodies. **c** Titers of lentiviral vectors. N.D. means below the detection limit of flow cytometric analysis for hrGFP expression. **d** Induction of FLAG-VPS4B-KQ and FLAG-Luc expressions by reverse vectors. GeneSwitch-293 cells were infected with vR-VPS4B-KQ or vR-Luc at a MOI of 1 and cultivated in the

absence of mifepristone. After sorting of cell clones that were capable of expressing hrGFP, the inducibility of FLAG-VPS4B-KQ and FLAG-luciferase expression was analyzed by western blotting. Mif (–) and Mif (+) indicate before and after induction with mifepristone, respectively. **e** Analysis of HIV-1 production in transduced cells. GeneSwitch-293 cell lines transduced with either vR-VPS4B-KQ or vR-Luc (and untransduced cells, mock) were transiently transfected with pNL4-3. The amount of HIV-1 virions present in the culture supernatant was measured by p24<sup>CA</sup> ELISA. The efficiency of HIV-1 release in the presence of 10 nM mifepristone is shown as a percentage of the value in the absence of mifepristone (mean  $\pm$  SD of three independent transfections). The *P* value versus no mifepristone treatment is <0.05 by Student’s *t* test (\*)