

を用いて SDS-PAGE を行った。抗 HA 抗体 (Sigma) によるウェスタンブロットにより、Vpx の発現下で候補蛋白の発現低下が認められるか否かを検証した。

5. Vpx と候補蛋白の相互作用

HA タグ付加候補蛋白発現ベクターまたは SAMHD1 (ヒト、サル、マウス由来) 発現ベクターと、FLAG タグ付加 Vpx-RRE 発現ベクター及び Rev 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションして 36 時間培養した。細胞溶解液を加えて遠心した上清を用いて、抗 anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma) による免疫沈降反応を行った。抗 HA タグ・モノクローナル抗体を用いた沈降物のウェスタンブロットにより、Vpx と候補蛋白または SAMHD1 との相互作用を検討した。

6. 候補蛋白のジーンサイレンシング実験

各 shRNA 発現レンチベクター、パッケージングベクター及び水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターを 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA Kit により定量した。THP-1 細胞に各 shRNA レンチベクターを MOI 50 で transduce して 96 時間培養した。その間、コントロール用の Vpr-RRE 発現ベクターまたは Vpr/Vpx 融合型発現ベクターと、Luciferase レンチトランスファーベクター、パッケージングベクター及び VSV-G 発現ベクターと共に 293T 細胞へコトランスフェクションし、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 ELISA Kit により定量した。前述の shRNA レンチベクターで transduce した各 THP-1 細胞に PMA (30 ng/ml; Sigma) を添加して 18 時間培養した後、Luciferase レンチベクターウイルスを 50 ng 感染させた。48 時間後に 100 μ l のライシスバッファー (Promega) を加えて細胞を溶解した。そのうちの 20 μ l を用いて、ルシフェラーゼ活性を Centro LB 960 (Berthold) を用いて測定することにより、感染性を定量化した。

7. Vpx 及び SAMHD1 の細胞内局在性

直径 13 mm のガラスカバースリップ (Nunc) 上の HOS 細胞に FLAG タグ付加 Vpx-RRE、Rev 発現ベクター、更にヒト、サル、マウス由来 HA タグ付き SAMHD1 をコトランスフェクションした。24 時間後に細胞を 4% パラフォル

ムアルデヒド固定、0.05% サポニン処理した後、抗 FLAG モノクローナル抗体 (Sigma) 及び抗 HA ポリクローナル抗体で一次抗体処理した。次に Cy3 標識抗マウス抗体または Cy5 標識抗ウサギ抗体 (Jackson Immunoresearch Laboratory 社) の二次抗体処理による間接蛍光抗体法により、DMRB 顕微鏡 (Leica) を用いて細胞内局在性を観察した。

8. HIV-1 感染者における宿主抗ウイルス蛋白 mRNA 発現レベルと病態進行の相関

東大医科研の岩本愛吉先生と立川愛先生の御協力により、また豪州王立パース病院の Simon Mallal 所長及び David Nolan 博士の御協力により HIV-1/AIDS 患者検体を得た。そのうちの 20 人の末梢血リンパ球より RNAqueous Kit (Ambion) を用いてトータル RNA を単離した。段階希釈したコントロール (GAPDH) 及び標的遺伝子 (APOBEC3G または BST-2) のスタンダードプラスミドとそれぞれのプライマー及び Taq-man プローブ 3 色 (GAPDH, Cy5; APOBEC3G, FAM; BST-2, HEX)、QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen) を用いて Mx3005P (Stratagene) による real-time RT-PCR を行い、標準曲線の linearity を確認した。患者検体における各遺伝子の発現レベルを multiplex real-time RT-PCR により定量した。

[倫理面への配慮] 遺伝子組換え実験は、国立感染症研究所・組換え DNA 実験安全委員会において平成 20 年 4 月 30 日付け承認番号・機 20-16 により、また大臣確認 (平成 20 年 10 月 21 日、国文科振第 31 号、感染研承認番号 大 20-10) により承認を得たプロトコールに従って行われた。また患者検体と用いた実験は、国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研究倫理審査において、平成 20 年 3 月 7 日付け承認番号 140 また平成 20 年 6 月 18 日付け承認番号 150 により承認を得たプロトコールに従って行われた。

C. 研究結果

1. HIV-1 Vpu の抗 BST-2 機能に関与する補助因子の探索.

我々は一昨年度までに、Vpu による BST-2 の downregulation 及びライソゾーム分解は、ユビキチン複合体構成蛋白 β TrCP に依存するこ

とを証明した。しかしこの依存性は部分的 (~50%) で、Vpu の抗 BST-2 活性の約半分には、未知の宿主因子が cofactor として関与している可能性が示唆された。今回まず β TrCP 結合不全変異型及びCT欠失変異型 Vpu レンチベクターウイルスを作製し、それらを用いて HeLa 細胞を transduce することにより安定発現細胞を樹立、その細胞の大量培養後の免疫沈降反応により、Vpu と相互作用する蛋白を大量に回収した。Cy3/Cy5 ラベリングによる二次元電気泳動を行った結果、 β TrCP 結合不全変異型 Vpu で特異的に検出される 67 種類のスポット、CT 欠失変異型 Vpu で特異的に検出される 21 種類のスポットを見出した。 β TrCP 結合不全変異型 Vpu との相互作用が認められた 67 種類のスポットを候補蛋白と見なしてゲルから切り出した。現在、ハイスループット MS 解析システムによる候補蛋白の同定が進行中である。

2. HIV-2 Vpx に不活化される抗ウイルス宿主因子の探索

ヒト樹状細胞またはマクロファージにおいて HIV-1 の感染効率は極めて悪いが、HIV-1 粒子に HIV-2 アクセサリー蛋白 Vpx を取り込ませると HIV-1 の感染効率が飛躍的に高まることが知られていた。このことから樹状細胞やマクロファージでは未知の抗ウイルス宿主因子の存在が考えられてきた。我々は今回まず、Vpx-Vpr 融合型発現ベクターの作製により Vpx 蛋白の HIV-1 ベクターウイルス粒子への取込みに成功した。健常人末梢血リンパ球から分離してきた精製 CD14 陽性細胞を IL-4 及び GM-CSF 存在下で樹状細胞に分化させた。それを用いて、コントロールレンチベクターと Vpr/Vpx 取込型レンチベクターの感受性比較を行った結果、Vpx を含むレンチベクターウイルスがコントロールウイルスに比べて 10 倍以上の感染性を示すことが判った。このことから樹状細胞で特異的に発現する宿主抗ウイルス因子が存在する可能性が示唆された。次にその宿主因子の同定を試みるために、樹上細胞で Vpx を過剰発現させるべく、Vpx を取り込ませ更に標的細胞中で Vpx を過剰発現するレンチベクターを作製した。トランスフェクションにより 293T 細胞から産生されたこのレンチベクターウイルスまたはコントロールベクターウイ

ルスに樹状細胞に感染させた。3 日後に細胞を溶解して、二次元電気泳動/銀染色を行いスポット比較した。選び出したスポットのプロテオーム解析により候補蛋白 8 種類を同定した。RT-PCR により作製これら候補蛋白及び先頃報告された SAMHD1 の cDNA を合成し HA タグ付き発現ベクターを作製した。293T 細胞へのトランスフェクション後のウエスタンブロットにより全ての候補蛋白の発現を確認した。これらが実際、Vpx に対して感受性を有するか、即ち Vpx との共発現により分解されるか否かを 293T 細胞へのコトランスフェクション実験にて検証した。候補蛋白 8 種類全てにおいて Vpx 存在下でそれらの発現量が低下することから、Vpx 依存的な分解の可能性が示唆され、二次元電気泳動のスポットに矛盾しない結果となった。これら候補蛋白が Vpx と相互作用するかについて、Vpx とのコトランスフェクション後の免疫沈降反応により検討した。その結果、SAMHD1 及び候補蛋白 8 種類中 6 種類が Vpx との相互作用を示すことが明らかになった。樹状細胞における抗ウイルス宿主因子としてこれらの蛋白が機能しているか否かを調べるためにジーンサイレンシング実験を現在行っている。この実験を簡便かつ迅速に行うために、単球系細胞株である THP-1 を PMA 処理により分化させて感染を行う実験系の樹立を試みた。PMA 処理 18 時間後の THP-1 細胞にルシフェラーゼレポーター遺伝子を有する Vpx 取込み型レンチベクターウイルスまたはコントロールウイルスを感染させ 48 時間後の細胞内ルシフェラーゼ活性を比較したところ、樹状細胞の場合とほぼ同様に、Vpx 取込み型ウイルスがコントロールウイルスに比べ 10 倍以上高い感染性を示すことを確認出来た。このことから、細胞株を用いて短期間で樹状細胞のフェノタイプを再現できることが判った。shRNA レンチベクターによるジーンサイレンシングにより現在まで 5 種類の候補蛋白のノックダウンに成功している。残り 3 種類に加え SAMHD1 については今後更に標的配列を変えて検討する必要がある。今回、ヒト以外にもサル及びマウス型 SAMHD1 の分子クローニングに成功し、その蛋白発現を確認した後、免疫沈降反応によって Vpx との相互作用を検討した。その結果、

ヒトの場合と異なりサル、マウス由来の SAMHD1 は Vpx に対する結合能がないことが明らかになった。最後にこれら3種の SAMHD1 及び Vpx の細胞内局在性を間接蛍光抗体法により検討した。ヒト・サル由来は明らかに核局在を示すのに対してマウスは細胞質のみに局在した。Vpx は細胞質・核ともに diffuse に分布した。SAMHD1 と Vpx との共発現においては、Vpx 発現により SAMHD1 の発現量が低下することはなく、両者の局在パターンにも変化は認められなかった。

3. HIV-1/AIDS 患者における抗ウイルス宿主因子の発現レベルと病態進行の相関性の有無.

HIV-1 感染者において CD4 陽性細胞数が多く血中ウイルス量が少ない、つまり病態進行が遅いほど、APOBEC3G や BST-2 等の抗ウイルス宿主因子の発現レベルが高いか否かについて検討した。豪州及び日本の HIV/AIDS 患者 20 名の末梢血リンパ球よりトータル RNA を抽出して、コントロールの house-keeping gene として GAPDH を抗ウイルス宿主因子として APOBEC3G と BST-2 を標的に real-time RT-PCR を行った。APOBEC3G と BST-2 共にその発現量と CD4 カウントの間に若干の相関性が認められたが、血中ウイルス量との間には殆ど相関性が認められなかった。

D. 考察

本年度は、まず HIV-1 Vpu の抗 BST-2 機能における補助因子の探索を行った。我々は昨年度、293T 細胞への BST-2 及び Vpu 発現ベクターのコトランスフェクション後に抗 BST-2 抗体による免疫沈降反応を行い、それに続いて SDS-PAGE/銀染色/プロテオーム解析を行ったが、得られた 9 種類の候補蛋白は何れも Vpu の抗 BST-2 活性には影響しないことが判った。本年度、我々はレンチベクターによる Vpu の大量発現とサンプルの大量調製を行った。その細胞溶解物からの免疫沈降物の二次元電気泳動で認められた 67 種類のスポットについて現在プロテオーム解析を行っているところである。

HIV-2/SIV Vpx の標的となる樹状細胞・マクロファージ特異的な抗 HIV-1 宿主因子の探索を本年度新たに開始し、まず Vpr を介して

HIV-1 粒子中に Vpx を取込ませることにより樹状細胞に効率よく感染できるレンチベクターウイルス実験系を樹立した。次にその系を利用して Vpx を発現させた樹状細胞の細胞溶解液を用いて二次元電気泳動を行い、コントロール樹状細胞とのスポット比較を行った。Vpx は Vif 同様にユビキチンリガーゼ複合体を形成することが知られていることから、未知の抗ウイルス宿主因子は Vpx によって分解を受けることが予想される。これにもとづき、Vpx 発現細胞では消失してコントロール細胞で認められるスポットを選び出し、プロテオーム解析を行った結果 8 種類の抗 HIV-1 宿主因子候補を得ることができた。これら蛋白のうち 6 種類は SAMHD1 同様に Vpx と相互作用することが免疫沈降反応により明らかになった。また 8 種類の候補蛋白全てにおいて、実際に Vpx との共発現により発現レベルが低下したことから、Vpx による分解が起きている可能性が強く示唆された。この分解がプロテアソーム或いはライソゾームに依るものかを今後検証していく予定である（因みに SAMHD1 は他の候補蛋白と比較して、Vpx による分解レベルが最も低い蛋白であった）。これらの蛋白の何れかが実際に抗ウイルス宿主因子であるかは、全て今後のジーンサイレンシング実験の結果にかかっており、今現在、shRNA として最適な標的配列を候補蛋白ごとに検索しているところである。SAMHD1 の種特異性を検討すべく、サル及びマウス由来の SAMHD1 の分子クローニングも行い、Vpx との相互作用及び細胞内局在性を調べた。その結果、Vpx と結合できるのはヒト型のみで、核局在を示さないのはマウス型のみであった。約 72kD の SAMHD1 はそのサイズゆえに核移行シグナルを持たなければ核に局在できないと考えられるが、今回の結果よりヒト及びサル型には核移行シグナルがあり、マウス型にはないことが示唆された。

HIV/AIDS 患者末梢血リンパ球を用いて抗ウイルス宿主因子 (APOBEC3G, BST-2) の mRNA 発現レベルと CD4 カウント/血中ウイルス量との関連を検討した結果、明らかな相関性は認められなかった。しかしながら今回のサンプルサイズは依然小さすぎることから、今後更に検体数を増やしていくと同時に他の抗ウイルス宿

主因子 (TRIM5 α 、SAMHD1) についても検討する予定である。

E. 結論

1. Vpu の抗 BST-2 機能に必要な補助因子同定を試み免疫沈降後の二次元電気泳動におけるスポット比較により 67 種類を抽出、現在プロテオーム解析中である。
2. Vpx-Vpr 融合型発現ベクターの作製により Vpx 取込み型/Vpx 発現レンチベクターウイルス粒子を作製した。それを用いて樹状細胞において Vpx を発現させた後、二次元電気泳動/プロテオーム解析により 8 種類の候補蛋白を得た。それら蛋白の発現ベクターを作製、トランスフェクションにより Vpx による分解及び Vpx との相互作用を確認した。現在ジーンサイレンシング実験が進行中である。またヒト、サル及びマウス型 SAMHD1 の発現ベクターを作製、共免疫沈降によりヒト型のみが Vpx と結合すること、間接蛍光抗体法によりヒト、サル型が核局在、マウス型が細胞質局在であることを見出した。
3. HIV/AIDS 患者由来末梢血リンパ球での APOBEC3G 及び BST-2 の mRNA 発現レベルと CD4 数または血中ウイルス量との間に明らかな相関性は認められなかった。

F. 健康危険情報 特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Arias, J.A., Iwabu, Y., and Tokunaga, K. Structural basis for antiviral activity of BST-2/tetherin and its viral antagonisms. *Front. Microbiol.* 2: 250, 2011.
- 2) Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M, Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T., and Ishizaka, Y. Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. *J. Cell Biol.* 194(5):721-35. 2011.
- 3) Ikeda, T., Abd El Galil, K., Tokunaga, K., Maeda, K., Sata, T., Sakaguchi, N., Harada, S.,

Heidmann, T., and Koito, A. Intrinsic restriction activity by apolipoprotein B mRNA editing enzyme APOBEC1 against the mobility of autonomous retrotransposons. *Nucleic Acids Res.* 39: 5538-5554. 2011.

- 4) Taneichi, D., Iijima, K., Doi, A., Koyama, T., Minemoto, Y., Tokunaga, K., Shimura, M., and Ishizaka, Y. Identification of SNF2h, a Chromatin-Remodeling Factor, as a Novel Binding Protein of Vpr of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. Neuroimmune Pharm.* 6:177-87. 2011.
- 5) Sapsutthipas, S., Kitagawa, Y., Tokunaga, K., Ikuta, K., and Kameoka, M. Viral factors involved in adapter-related protein complex 2 alpha 1 subunit-mediated regulation of human immunodeficiency virus type 1 replication. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.* 42:311-319. 2011.

学会発表

- 1) Nii-Trebi, N., Kinomoto, M., Brandful, J., Barnor, J., Tatsumi, M., Sata, T., Ampofo, W., Osei-Kwasi, M., Tokunaga, K.: Infectivity of HIV-1 Subtypes Isolated from Ghanaian Patients. WSU Joint International Conference. East London, South Africa, 2011.9.
- 2) Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga, Tetsutaro Sata, Yukihito Ishizaka: HIV-1 DNA integration into host chromosomal double-strand break sites is not attenuated by raltegravir, an integrase inhibitor. IUMS 2011, Sapporo, Japan, 2011.9.
- 3) 藤田英明、岩部幸枝、佐多徹太郎、徳永研三、田中嘉孝: 膜結合型ユビキチンリガーゼ MARCH8 によるトランスフェリン受容体のユビキチン化およびダウンレギュレーションの分子機構. 第 84 回日本生化学会大会 (京都) 2011.9.
- 4) Yukie Iwabu, Juan F. Arias, Masaru Yokoyama, Hironori Sato, Tetsutaro Sata and Kenzo Tokunaga: Homodimerization of APOBEC3G is required for inhibition of Alu retrotransposition. *Frontiers of Retrovirology Conference* 2011, Amsterdam, The

Netherlands, 2011. 10.

- 5) Takayoshi Koyama, Kenzo Tokunaga,
Yukihito Ishizaka: HIV-1 integraion into host
DNA double-strand break sites is the majority
event in integrase inhibitor-treated cells. 第
34 回日本分子生物学会（横浜）2011. 12.

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

マクロファージ感染に関与する宿主側因子の同定

研究分担者 石坂 幸人 国立国際医療研究センター 難治性疾患研究部 部長

研究要旨：ウイルス DNA のゲノムへの挿入は、DNA 損傷によって上昇し、この現象がインテグラーゼ(IN)阻害剤では抑制できない事、また IN 阻害剤存在下に挿入されたプロウイルス DNA が機能性を示し、感染性を有する二次ウイルスが産生された。そして、DNA 損傷を誘導する Vpr は IN 活性非依存的なプロウイルス DNA の挿入頻度を上昇させ、その現象はマクロファージへの感染において特に顕著であった。一方、Vpr 誘発 DNA 損傷に関与する宿主側因子としてトポイソメラーゼ I(Topo-I)を同定した。

A. 研究目的

本分担研究では潜伏感染状態の温床となっているマクロファージへのウイルス感染機序と関与する宿主因子を明らかにする。マクロファージにおけるウイルス感染及び産生は、ウイルス感染初期と潜伏感染状態からのウイルス再産生機序の2つのステップで理解することが重要である。潜伏感染状態からのウイルス再産生機序として Vpr がマクロファージからの IL-6 産生を介して、間接的に潜伏感染細胞からのウイルス再産生に関与することを報告した。

今年度はマクロファージへのウイルス初期感染機序に照準を絞り、

- a. DNA 二重鎖切断(以下 DSB:DNA double-strand break) のウイルス感染における意義
- b. Vpr によって誘導される DSB 誘発の分子機序の解析
について解析した。

B. 研究方法

a. DSB のウイルス感染における意義

i) 感染条件：HIV-1 はインテグレーションの過程において宿主の DNA 修復因子を利用していると考えられている。DNA 修復のキーファクターである DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) と ataxia telangiectasia mutated (ATM) が HIV-1 感染に重要であるとの報告がある [R. Daniel et al., Science, 1999; A. Lau et al., Nat Cell Biol, 2005] 一方で、必要ないとの報告もある [Y. Ariumi et al., J Virol, 2005]。また、DNA damage によって HIV-1 感染効率が高まるとの報告があるが、細胞の種類や条件によっては影響がない場合もある [J.A. Smith and R. Daniel, Biotechnol Lett, 2010]。感染効率に対する DNA damage の影響を調べるため、Luc 遺伝子を持つ NL4-3 由来の VSV-G シュードタイプウイルスを用い、感染時に DNA damage agent である Etoposide または Bleomycin を添加し、Luc

アッセイによって感染効率を調べた。細胞は HT1080、TIG-3 (human primary fibroblast)、MT-4、monocyte-derived macrophage (MDM) を用いた。HT1080 と TIG-3 細胞の分裂にともなって生成される DNA 損傷の影響を除外するため、それぞれ 0.1% FBS を含む培地での Serum starvation 処理あるいは、Nocodazole 処理下の実験を行なった。また、IN-CA 活性を持たないウイルスとして、IN の 64 番目のアスパラギン酸 (D) をアラニン (A) に変えた D64A 変異ウイルスを作製し、実験に用いた。Integration 効率の測定は Alu-PCR 法あるいは、NeoR 遺伝子を持つウイルスを用いたコロニーアッセイ法によって行った。

ii) プロウイルスの末端と宿主ゲノム境界部の塩基配列情報の収集：IN 阻害剤 Raltegravir (RAL) 存在下 (10 μ M) に挿入されたプロウイルスに挿入や欠失 InDel (insertion and/or deletion) がみられるかを調べるため、linear-amplification-mediated (LAM)-PCR 法によってプロウイルス/ゲノム境界部の DNA 断片を増幅し、シークエンスを決定した。

iii) IN-CA 非依存的な感染の複製能の解析：IN-CA 非依存的にインテグレーションしたプロウイルスには InDel が多くみられるため、機能性を失っている可能性が示唆された。そこで、RAL 存在下 (10 μ M) で Replication competent NL4-3 を MT-4 細胞に感染させ、2 日おきに回収した培養上清に含まれるウイルスの感染能を MAGIC-5 細胞で調べた。また、同様の実験を Replication competent NL4-3-D64A 変異ウイルスでも行った。さらには、MT-4 細胞の培養液中から感染 8 日目あるいは 12 日目に RAL を取り除き、RAL を添加し続けた場合に比べて、感染性を示すウイルスが増加するかを調べた。

iv) MDM を用いた IN-CA 非依存的なウイルス複製能の解析: ADA (R5-tropic ウイルス) 由来の *env* を持つ Replication competent NL4-3 を RAL 存在下 (10 μ M) で MDM に感染させ、IN-CA 非依存的なウイルス複製における DNA damage の影響を調べた。MDM の培養液中に Etoposide あるいは Bleomycin を加えて (感染の 0-2 日目まで) DNA damage を与え、2 日おきに培養上清を回収し、HIV-1 RNA コピー数を qRT-PCR 法によって調べた。

b. Vpr によって誘導される DSB 誘発の分子機序の解析。

i) Vpr による DSB 誘発に関与する宿主因子の同定: 野生型 Vpr に Flag タグを付与した蛋白質を HEK293T 細胞に強制発現させ、細胞抽出液から抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降法 (IP: immunoprecipitation) で Vpr 自身と Vpr 結合タンパクを回収した。この沈降物中に存在する DNA に対する作用を調べるため、スーパーコイル型プラスミド DNA と二価イオン共存下に 30 分間インキュベートした後、アガロース電気泳動法で解析した。また、トポイソメラーゼ I (TopoI) 特異的阻害剤であるカンプトテシン (CPT) を添加し、DNA の泳動度の変化の有無を観察した。

ii) TopoI が Vpr による DSB 誘導に機能するかを明らかにするために TopoI に対する siRNA を用いて発現を抑制し、細胞培養液中へのリコンビナント Vpr 添加による DSB 誘導をコメントアッセイで評価した。

iii) TopoI と Vpr の相互作用ドメインを決定するためにリコンビナント TopoI の精製系を確立した。6xHis-TopoI-HA 発現コンストラクトを作成し、大腸菌の発現系より Ni-ビーズと抗 HA-tag 抗体を用いた精製系により高純度の TopoI タンパクを精製した。これを用いてすでに精製系の確立した GST-Vpr との *in vitro* における相互作用の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本課題は主として細胞株を用いる研究であり、ヒト検体を対象とした内容ではない。組み換え生物を用いた実験であり拡散防止措置は大臣確認実験として行う。そのための研究計画書は文科省に申請し、平成 18 年 5 月 31 日付け、17 国文部科学振興第 68 号で確認済みである。平成 22 年度、再度 大臣確認実験申請を行い、22 受文科振第 66 号として承認され (平成 22 年 5 月 18 日付)、平成 25 年 3 月 31 日まで継続可能である。

C. 研究結果

a. DSB のウイルス感染における意義と機序

i) IN-CA 変異ウイルスでは DNA damage によって再現良く感染効率が高まる: HT1080、TIG-3、MT-4、monocyte-derived macrophage (MDM) に

Etoposide あるいは Bleomycin を使って DNA damage を与えて感染効率を調べた。その結果、Nocodazole 処理によって細胞周期を止めた TIG-3 細胞でのみ両薬剤によって感染効率の上昇が認められた。次に、昨年度までの研究において、HIV-1 DNA が宿主ゲノムの DSB 部位に挿入されること、さらにこの挿入は IN-CA 非依存的であることを見出したことから、IN-CA 非依存的な感染における DNA damage の影響を調べた。その結果、上述した 4 種類の細胞すべてで Etoposide と Bleomycin によって感染効率が高まった。また、Alu-PCR 法と NeoR 遺伝子を持ったウイルスによるコロニーアッセイの結果、両薬剤によってインテグレーション効率が高まっていることが明らかとなった。

ii) IN-CA 非依存的に挿入されたプロウイルスの末端配列には InDel (insertion and/or deletion) が多くみられる: 昨年度までの研究において、DSB 部位へ挿入されたプロウイルスの末端配列を調べたところ、挿入や欠失が高頻度にみられた。そこで、RAL 存在下に挿入されたプロウイルスにも挿入や欠失がみられるかを調べるために LAM-PCR 法によってプロウイルス/ゲノム境界部の塩基配列を増幅、解読した。その結果、RAL 存在下で感染させた場合には、約 90% (17 個のクローン中 15 個) の割合で Breakpoint (ウイルス DNA とゲノム DNA の境界部) 近傍に塩基の欠失や挿入が認められたのに対して、RAL の溶媒として使用した dimethylsulfoxide (DMSO) 添加群では、解析した 20 クローン中、同様の塩基変異は 1 クローン (5%) のみであった。

iii) IN-CA 非依存的に挿入されたプロウイルスは機能性を保持したウイルス粒子を産生する: RAL 存在下、即ち IN-CA 非依存的に挿入されたプロウイルスの末端配列には高頻度に InDel が検出されたことから、機能性を失っている可能性が示唆される。そこで、MT-4 細胞に Replication competent NL4-3 を感染させ、2 日おきに回収した培養上清に含まれるウイルスの感染能について、MAGIC5 細胞を使って調べた。その結果、RAL を添加した状態でも感染 8~10 日目の培養上清中に感染性のあるウイルス粒子を検出された。また、IN-CA 活性を持たない D64A ウイルスでも同様の結果であった。さらに、MT-4 細胞の培養液中から感染 8 日目あるいは 12 日目に RAL を取り除くと、感染性を持つウイルス粒子の産生が RAL を入れ続けた状態よりも高まった。

iv) DNA damage によって IN-CA 非依存的なウイルス複製が高まる: 次に、ADA (R5-tropic ウイルス) 由来の *env* を持つ Replication competent NL4-3 を用いて MDM での IN-CA 非依存的なウイルス複製における DNA damage の影響を調べた。

Etoposide あるいは Bleomycin を感染 0-2 日目まで加えて DNA damage を与えたところ、コントロールに比べてウイルス産生能が高まった。

b. Vpr によって誘導される DSB 誘発の分子機序の解析

i) Vpr による DSB 誘発に関与する宿主因子の同定: Flag 付 Vpr を HEK293T 細胞に発現させ、Flag 抗体で Vpr と複合体を形成する蛋白質を回収し、プラスミド DNA と作用させた。その後 DNA をフェノールクロロフォルムで抽出し、電気泳動するとスーパーコイル DNA とは異なる泳動パターンを示すことが分かった (フォーム B)。スーパーコイル DNA が示す泳動パターン (フォーム A) と比較するとフォーム B の泳動速度は遅く、DNA に Nick または DSB が誘導されている可能性または、DNA のトポロジカルな変化が誘導されている可能性の 2 通りが考えられた。

そこでまず、フォーム B に標識ヌクレオチド存在下に TDT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) を作用させ、切断が誘導されているか否かを検証したところ、標識ヌクレオチドが DNA に標識されることが無かったことから、プラスミド DNA には、切断断端が存在していない事が示唆された。

以上の結果から、上記 2 つの可能性の内、プラスミド DNA の弛緩 (トポロジー変化) が誘導されている可能性が示唆された。スーパーコイル DNA が弛む構造変化にトポイソメラーゼ I (TopoI) が関与している可能性を考え、Vpr 複合体をプラスミド DNA に作用させる際に TopoI 阻害剤である CPT を添加し、その作用の有無を解析した。その結果、CPT の作用によって、Vpr 沈降物による DNA 構造変化誘導が阻害された。以上の結果から、Vpr によるプラスミド DNA 弛緩誘導には TopoI の関与が強く示唆された。

次に、細胞内での Vpr と TopoI との機能的な関連性を証明するため、IP 後のウェスタン解析 (WB) を行った。その結果、Vpr と TopoI は細胞内で複合体を形成していることがわかった。同様の結果が *in vitro* におけるリコンビナント蛋白質の結合実験より得られており、Vpr と TopoI は直接的に結合することが明らかとなった。

さらに TopoI が Vpr による DSB 誘導に関与するか否かを調べるため、TopoI を siRNA によりノックダウンした状態で、リコンビナント Vpr による DSB 誘導をコメントアッセイにより評価したところ、TopoI siRNA の導入下では、Vpr による DSB の誘導が軽減されることが示された。

次に Vpr による TopoI 依存的な DSB 誘導機構を明らかにするために、Vpr 発現誘導時の TopoI 発現量を評価したところ、Vpr の発現により TopoI 蛋白質量が減少していることを見出した。TopoI 蛋白質を免疫沈降で回収し、TopoI のユビキチン化について解析すると Vpr の発現により TopoI のユビキチン化が促進されていることが示された。

これらの結果は Vpr の発現により TopoI 機能が阻害され、Cleavage complex (TopoI-DNA の不可逆的な複合体) が形成されていることを示唆している。Cleavage complex 形成を評価するために TopoI に対する native ChIP アッセイを行ったところ、TopoI 阻害剤であるカンプトテシン処理と同様に、Vpr 発現誘導により TopoI の複数遺伝子座上への共有結合量が増加しており、Vpr が TopoI 機能を阻害し Cleavage complex 形成を介して DSB を誘導するという経路が存在することが強く示唆された。

D. 考察

a. DSB のウイルス感染における意義

これまでに HIV-1 感染における DNA damage の意義について一定の見解は得られていなかった。本研究においても細胞の種類や培養条件によって DNA damage の感染効率への影響が異なった。一方で、前年度までの研究によって着目した IN-CA 非依存的な感染における DNA damage は調べたすべての細胞と培養条件で感染効率を高めた。また、DNA damage を与えない状態での IN-CA 非依存的な感染効率は細胞の種類によって約 100 倍異なることから、IN-CA 非依存的な感染への感受性の差異が DNA damage による感染効率への影響に反映されている可能性が示唆される。

IN-CA 非依存的に挿入されたプロウイルスには InDel が約 90% みられた。このことから、特に「欠失」を認めるプロウイルス DAN の場合にはウイルス産生機能を失っている可能性が考えられた。そこで、IN-CA 非依存的に感染したウイルスの複製能と二次ウイルスの感染能を調べたところ、機能性を保持していることが明らかとなった。これらの結果から、RAL を投与している患者体内においても機能性を持ったウイルス複製が起こる可能性が示唆され、IN-CA 以外を標的とする IN 阻害剤の開発が重要である。

DSB サイトへのウイルス挿入が IN^{D64A} ウイルスでも認められること、また RAL 存在下でも DSB サイトへのウイルス DNA の挿入が認められたことは、ゲノムへのウイルス DNA の挿入の一部が宿主細胞側の反応として誘導されていることを意味する。即ち、RAL は DSB で増強するウイルス感染効率を阻害できない可能性が示唆される。臨床的に抗エイズ薬でウイルス DNA が体内から駆逐できないことが大きな問題となっている。今回の解析結果は、RAL がウイルス DNA のゲノム挿入へのステップを完全には阻害しきれない事を意味し、IN-CA 以外を標的とする IN 阻害剤の開発の必要性を示唆する。

この IN 活性非依存的なインテグレーションは MDM の場合、全体の約 1% の頻度で生じ、さらに DNA 損傷がウイルス DNA のゲノム挿入において重要な役割を果たしていることが分かった。また、DNA 修復に関わる宿主因子である ATM が DSB

サイトへのインテグレーションに重要であることも明らかとなった。従来から IN 活性非依存的なインテグレーションの存在は分かっていたが、そのメカニズムは不明であった。今回、IN 活性非依存的なインテグレーションには DSB が重要な役割を担っていることが示唆された。

ウイルス/ゲノム DNA の Breakpoint を含む塩基配列の解析によって、RAL 存在下で感染したイベントの場合には、遺伝子欠損や挿入が高頻度に観察された。この事は、IN 阻害剤を服用中の症例を対象に末梢血細胞中のプロウイルス DNA/ゲノム境界部位の塩基配列を解析すれば、実際のウイルス感染においてどの程度 IN-CA 非依存的にウイルス感染が成立しているかについて類推できるものと思われる。

b. Vpr による DSB 誘発に関与する宿主因子の同定
今回、新規 Vpr 結合蛋白質として TopoI を同定した。Vpr が TopoI の cleavage complex 形成を誘導し DSB を誘発していることが強く示唆されたことから、Vpr と TopoI の相互作用ドメインを決定することにより Vpr による Cleavage complex 誘導機序を明らかにし、さらに相互作用ドメインを構成するペプチドを投与することによる Vpr による DSB 誘導、および HIV-1 感染効率への影響を評価したい。

c. MDM 感染における DSB と Vpr の役割

Vpr が DSB を誘発することから、特に静止細胞へのウイルス感染効率に対して「正」の制御因子として作用することが強く考えられる。Vpr による感染効率の変化を MDM 及び D64A ウイルスを用いて評価したところ、野生型 Vpr 遺伝子を有するウイルスの感染効率は Vpr 変異ウイルスと比較して約 100 倍優れていることが分かった。すでに報告されているように、Vpr による Preintegration complex の核内移行に対する作用を吟味することは肝要である。しかし、DSB に伴ってウイルス DNA が核内に移行することも考えられることから、純粋に Vpr の核内移行機能を評価することは難しい。Vpr が D64A ウイルスの感染効率を上昇させる事実は、IN-CA 変異体が障害されている機能即ち、ゲノム DNA へのウイルス DNA の挿入ステップで Vpr が作用していることを示唆する。

E. 結論

DSB によって IN-CA 非依存的なウイルス複製が高まることまた、DSB サイトがウイルス感染の際のプラットフォームとして機能する。また、IN 阻害剤は、DSB で誘導されるウイルス挿入を阻害できない。また、MDM では Vpr によって IN-CA 非依存的なインテグレーション頻度が 100 倍程度上昇し、Vpr による DNA 損傷作用は TopoI 作用を介して誘導されている可能性が示唆された。

IN 非依存的(IN 阻害剤存在下)に感染したプロ

ウイルス DNA から二次ウイルス産生が誘導されることを示すことから、潜伏感染病態において DSB は究めて重要な意味をもつと考えられる。

F.健康危険情報：特記すべき事無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M., Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T. and Ishizaka, Y.: Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation, *J. Cell. Biol.* 194:721-35, 2011.
- 2) Taneichi, D., Iijima, K., Doi, A., Koyama, T., Minemoto, Y., Tokunaga, K., Shimura, M., Ishizaka, Y.: Identification of SNF2h, a chromatin-remodeling factor, as a novel binding protein of Vpr of human immunodeficiency virus type 1. *J. Neuroimmune Pharmacol* 6:177-87, 2011.

2. 学会発表

- 1) Koyama, T., Tokunaga, K., Sata, T., Ishizaka, Y.: HIV-1 DNA integration into host chromosomal double-strand break sites is not attenuated by raltegravir, an integrase inhibitor. IUMS 2011, Sapporo, September, 2011.
- 2) Koyama, T., Tokunaga, K., Ishizaka, Y.: HIV-1 integration into host DNA double-strand break sites is the majority event in integrase inhibitor-treated cells. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜.
- 3) 飯島健太、奥平准之、田村政人、石坂幸人 DNA 二重鎖切断による LINE-1 レトロトランスポジション誘導機構. 2011,12/1. 日本分子生物学会(横浜).
- 4) Ishizaka, Y., Okudaira, N., Oka, S., Okamura, T. : Neurocognitive disorder by Vpr-induced retrotransposition of LINE-1. The 12th Kumamoto AIDS seminar GCOE Joint International symposium. Kumamoto, October, 2011
- 5) 石坂幸人 : HIV-1 アクセサリー蛋白質 Vpr の陰と陽. 第 13 回白馬シンポジウム. 札幌、5 月、2011.
- 6) Shimura, M., Toyoda, Y., Iijima, K., Kinomoto, M., Tokunaga, K., Yoda, K., Yanagida, M., Sata, T. and Ishizaka, Y.: Epigenetic displacement of HP1 from heterochromatin by HIV-1 Vpr causes premature sister chromatid separation. The 6th German-Japanese HIV-1 Symposium. Bohoem, November, 2011.

- 7) Ishizaka, Y., Okudaira, N., Oka, S., Okamura, T.: HIV-1 associated neurocognitive disorder by retrotransposition by Vpr. The 6th German-Japanese HIV-1 Symposium. Bohoem, November, 2011.
- 8) Matsunaga, A., Shimura, M., Mochizuki, M., Ishizaka, Y., Hagiwara, S.:DNA methylation profiling inn HIV-1 associated lymphomas. The 6th German-Japanese HIV-1 Symposium. Bohoem, November, 2011.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 該当無し
2. 実用新案登録 該当無し
3. その他

発 明 人；石坂幸人、長谷川正勝、野原 聡

発明の名称；「新規核移行ペプチド」

PCT/JP2008/054563

出願人；国立国際医療研究センター総長

移行手続き完了；2009/9/8

欧州での特許承認

宿主因子による HIV 抑制法の開発研究

研究分担者 小柳 義夫 京都大学ウイルス研究所 教授
研究協力者 佐藤 佳 京都大学ウイルス研究所 助教
研究協力者 小林 朋子 京都大学医学研究科 大学院生

研究要旨：HIV-1 放出抑制因子である BST2 の機能解析を、培養細胞実験ならびにヒト化マウスをつかっておこなった。その結果、BST2 拮抗分子である HIV-1 アクセサリ蛋白質 Vpu との結合に関わる BST2 アミノ酸部位を同定した。さらに、ウイルス感染最初期の個体内において BST2 は、HIV-1 感染を負に制御していることが強く示唆された。はじめて、BST2 の生体内における抗 HIV 作用を明らかにした。

A. 研究目的

HIV の増殖を制御する宿主因子が近年次々と見つかかり、その意義の解明、そしてそれを基盤とする新たな治療法の開発は、現在の highly active antiretrovirus therapy (HAART) 療法に加えたエイズ制御法につながる。特に、宿主細胞内に内在的に発現する分子による制御法は、これまでの逆転写酵素やプロテアーゼなどのウイルスがコードする酵素に対する阻害薬剤による治療法と異なり、生体内の宿主因子を利用しようとする戦略であり、全く新しい治療技術となる。本研究は、宿主因子によるウイルス抑制メカニズムとその有用性を明らかにすることを目的とする。今回の解析の標的分子はインターフェロン (IFN)、さらに、その IFN により誘導される分子の中で HIV 抑制活性が知られている宿主因子を解析する。特に HIV-1 アクセサリ蛋白質である Vpu によってその機能が阻害される tetherin/BST2 の機能ドメインを試験管内培養細胞実験、そして、BST2 の生体内における役割を感染動物モデル実験により解明する。その動物モデルは、分担研究者が開発したヒト造血幹細胞の重度免疫不全 NOG マウスへの移植により作出される“ヒト化マウス”であり、個体内における HIV-1 増殖複製の解析が可能な実験系である (Virology 394:64-72, 2009)。これらの実験系を用いて、BST2 分子の影響を検討した。

B. 研究方法 (倫理面への配慮)

1) 試験管内分子間結合とウイルス放出抑制実験
bi-molecular fluorescent complementation (BiFC) 法による分子間相互作用定量系を用いて BST2 変異体の Vpu に対する結合量測定を行った。また、ウイルス放出に対する BST2 変異体の抑制活性解析のために、293 細胞へそれらの変異体 BST2 発現 DNA と感染性 HIV-1 DNA

のコトランスフェクションを行い、培養上清中のウイルス量を測定した。

2) ヒト化マウスの作製と HIV-1 感染実験

ヒト CD34 陽性細胞を分離し、NOG 新生児マウスへの移植によりヒト化マウスを作製した。このマウスに野生型あるいは Vpu 欠損 HIV-1_{AD8} 株を腹腔より接種し、ウイルス感染後のウイルス量を RNA PCR 法により、IFN-beta 誘導レベルを ELISA キット、そして、p24 抗体 (2C2; 琉球大学田中勇悦博士より分与) によって染色されるウイルス感染細胞における CD4 や BST2 などの細胞表面マーカーの変化を flow cytometry にて解析した。

3) 統計処理

2 群の比較にはウェルチの t 検定を行なった。P 値が 0.005 以下のものは統計学的に有意な差があるものとした。

(倫理面への配慮)

動物実験の施行にあたり本学実験動物委員会から動物愛護上の配慮ならびに感染実験の適切な施行を行うように指導を受けた。すべての実験は本委員会より承認されている。また、CD34 陽性細胞の採取にあたり同意 (インフォームド・コンセント) を得るとともに本学倫理委員会より承認を得ている。

C. 研究結果

1) Vpu の機能発現機序 : BST2 と Vpu の相互作用ドメインの詳細解明のために、Vpu と結合能がないマウス BST2 とヒト BST2 のキメラ分子による相互作用解析実験から、ヒト BST2 の膜貫通領域 (TM) が Vpu との結合に唯一必須な領域であることがわかった (論文 1)。次にヒト BST2 TM のアラニン置換変異体により I34、L37 および L41 が相互作用にそれぞれ必須なアミノ酸残基であった (図 1 A, B)。これらの 3 つのアラニン置換変異体は、

ウイルス放出実験において Vpu による促進作用に対して抵抗性を示すことから、これらのアミノ酸は Vpu との相互作用だけでなくその反応性の決定基であることを見出した (図 1 C)。さらに興味あることに、これらのアミノ酸残基は Vpu に拮抗されない非ヒト科霊長類の BST2 TM においても広く保存されている (図 1 D)。しかしながら、非ヒト科霊長類 BST2 では上流に 2 アミノ酸欠損があり、さらにこれらは 2 アミノ酸挿入により Vpu との結合能を獲得することがわかった (論文 1)。

2) ウイルス感染小動物モデルにおける IFN 誘導性と Vpu の必要性 : Vpu 欠損ウイルスに比べ野生株のウイルス感染マウスでは早期に感染後 7 日以降に血中 IFN-beta の増加が起きていることを見出した (結果示さず)。また、Vpu 欠損ウイルスでは感染後早期の血漿ウイルス RNA レベルが野生株のそれに比して明らかに低下していた (図 2, A)。また、Vpu を有する HIV-1 では、Gag p24 陽性のウイルス感染細胞表面上の CD4 とともに BST2 の発現が低下していた (図 2, B, C)。それに比べて、Vpu 欠損ウイルスでは、その発現低下は減弱化していた (図 2 B, C, 論文 6)。さらに、マウス脾臓において細胞外 Gag p24 量が感染後 7 日目においては、Vpu を有する野生型 HIV-1 では増加していることを見出した (結果示さず)。なお、同じヒト化マウスが EBV 感染血球貪食症候群のモデルマウスになることを見出した (論文 2)。

3) ウイルス抑制因子の解明 : APOBEC3 と同じ分子群で HIV 抑制活性を有するとして知られる APOBEC1 が、ヘルペスウイルスである HSV1 にも抑制作用を有することを見出した (論文 4)。

D. 考察

BST2 は N 末側に細胞質内領域に続き TM、そして C 末端に GPI アンカーを有するその分子構造も特異な膜蛋白のひとつである。そして、本研究により、その拮抗分子である Vpu との結合はそれぞれの分子の TM 領域に限定されることがわかった。さらに BST2 の I34、L37 および L41 アミノ酸が結合に関与することがわかった。これらのアミノ酸の重要性は、最近の NMR のよる構造解析からも確認された (Skasko et al. J. Biol. Chem. 287:58-67, 2012)。これらの結合は、Vpu の BST2 への拮抗作用に直接関与することも今回の実験から判明し、今後の HIV 抑制薬剤開発への基盤知見となる。

次に、HIV-1 感染モデル動物の解析実験により、感染個体内では急性期において Vpu 依存的に CD4 と BST2 の発現抑制が起き、効率的なウイルスの細胞外への放出がはじめて確認された。これは Vpu を標的とする抗 HIV 戦略の正当性を示すものである。

E. 結論

これまで試験管内実験に抗ウイルス活性が示されてきた BST2 分子は、生体内においても HIV-1 感染に負に制御していること、そして、この作用は Vpu の拮抗作用により解除されることが確認された。

F. 健康危険情報

HIV-1 の感染実験、ウイルスの保管は全て京都大学ウイルス研究所で定める感染微生物取り扱い安全管理委員会、動物委員会、組換え DNA 委員会の規定に基づき、すべて P3 実験施設で行われた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S.P., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H., and Koyanagi, Y.: Identification of amino acids in the human tetherin transmembrane domain responsible for HIV-1 Vpu interaction and susceptibility. *J. Virol.* 85:932-945, 2011.
- 2) Sato, K., Misawa, N., Nie, C., Satou, Y., Iwakiri, D., Matsuoka, M., Takahashi, R., Kuzushima, K., Ito, M., Takada, K., and Koyanagi, Y.: A novel animal model of Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. *Blood*, 117:5663-5673, 2011.
- 3) Sato, K., and Koyanagi, Y. : The mouse is out of the bag: insights and perspectives on HIV-1-infected humanized mouse models. *Exp. Biol. Med.* 236:977-985, 2011.
- 4) Gee, P., Ando, Y., Kitayama, H., Yamamoto, S.P., Kanemura, Y., Ebina, H., Kawaguchi, Y., and Koyanagi, Y.: APOBEC1-mediated editing and attenuation of herpes simplex virus 1 DNA indicate that neurons have an antiviral role during herpes simplex encephalitis. *J. Virol.* 85:9726-9736, 2011.
- 5) Watanabe, T., Urano, E., Miyauchi, K., Ichikawa, R., Hamatake, M., Misawa, N., Sato, K., Ebina, H., Koyanagi, Y., and Komano, J.: The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 2011 Nov 22.
- 6) Sato, K., Misawa, N., Fukuhara, M., Iwami, S., An, D.S., Ito, M., and Koyanagi, Y.: Vpu augments the initial burst phase of HIV-1 propagation and downregulates BST2 and CD4 in humanized mice. *J. Virol.* in press.

2. 学会発表

- 1) Sato, K., Misawa, N., and Koyanagi, Y.: Dynamics of human-specific virus infection in humanized mice. T lymphocyte dynamics in acute and chronic viral infection - Infectious Disease Research Network, London, England, 2011 年 1 月

- 2) Gee, P., and Koyanagi, Y.: P202 binds to retrovirus preintegration complex and attenuates retrovirus infection when fused with an inflammasome pyrin binding domain. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Boston, 2011年2月
- 3) Kobayashi, T., Ode, H., Yoshida, T., Sato, K., Gee, P., Yamamoto, S.P., Ebina, H., Strebel, K., Sato, H., and Koyanagi, Y.: Mutagenesis and Molecular Modeling Studies Reveal Structural Insights into Human Tetherin Recognition by HIV-1 Vpu. 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), poster, Boston, 2011年2月
- 4) Iwami, S., Sato, K., Misawa, N., Kobayashi, T., De Boer, R., and Koyanagi, Y.: DNA labeling system by peripheral blood of humanized mouse. 1st International Symposium on Innovative Mathematical Modeling, P-215, Tokyo, 2011年3月
- 5) 小柳義夫, 細胞性 HIV 抑制因子. 第2回 ナノバイオ創薬研究シンポジウム, 京都, 2011年3月
- 6) Koyanagi, Y.: Intracellular anti-HIV factor, International Symposium. Virus, host and diseases. Kyoto 2011年3月
- 7) Sato K., Misawa N., Satou Y., Matsuoka M., Ito M. and Koyanagi Y.: Efficient HIV-1 infection in regulatory CD4+ lymphocytes during acute phase in humanized mice. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, New York, USA, 2011年5月
- 8) Yoshida, T., Shingai, M., Martin, M.A., Kobayashi, T., Koyanagi, Y., and Strebel, K.: Discrepancy of the potential of Vpu to interact and counteract BST-2. Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, New York, USA, 2011年5月
- 9) 佐藤佳, 三沢尚子, 小柳義夫. ヒト化マウスモデルを用いた HIV-1 感染病態の解析, 第25回近畿エイズ研究会, 京都, 2011年6月
- 10) Ebina, H., Kanemura, Y., Suzuki, Y., Urata, K., and Koyanagi, Y.: Integrase independent retroviral cDNA integration, which is indefensible with integrase inhibitor. 第6回研究所ネットワーク国際シンポジウム, 東京, 2011年6月
- 11) 小柳義夫. 小さなウイルスがなぜ病気を起こすのか. 第10回みちのくウイルス塾, 仙台 2011年7月
- 12) 小柳義夫, Peter Gee, 川口寧, 北山裕子, 安藤良徳. APOBEC1によるHSV-1 DNAのeditingと抗ウイルス効果. 第18回ヘルペス感染症フォーラム (JHIF) 札幌 2011年8月
- 13) Iwami, S., Sato, K., and Koyanagi, Y.: Mathematical modeling and in vitro experiments in virology. Korean Society for Mathematical Biology 2011 annual meeting, Ulsan, Korea, 2011年8月
- 14) Watanabe, T., Urano, E., Miyauchi, K., Ichikawa, R., Hamatake, M., Sato, K., Hirota, E., Koyanagi, Y., and Komanao, J.: The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI/D4GDI limits HIV-1 replication. XV International Congress of Virology, 札幌, 2011年9月
- 15) Sato K., Misawa N., Ito M. and Koyanagi Y. HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. XV International Congress of Virology, 札幌, 2011年9月
- 16) Ebina, H., Kanemura, Y., Suzuki, Y., Urata, K., and Koyanagi, Y. HIV-1 cDNA integration and persistent infection by DNA repair system. XV International Congress of Virology, 札幌, 2011年9月
- 17) Koyanagi, Y., and Sato K.: Depletion of regulatory T cells in acute phase may enforce HIV systemic infection. 12th Kumamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, 熊本, 2011年10月
- 18) Gee P., Okamoto S., Fukuhara M., Kanemura Y., Ebina H. and Koyanagi Y. Biochemical characterization of the HIV-1 restriction factor SAMHD1. 12th Kumamoto AIDS Seminar-GCOE Joint International Symposium, 熊本, 2011年10月
- 19) Sato, K., Misawa, N., Ito, M., and Koyanagi, Y.: HIV-1 Vpr protein accelerates HIV-1 replication during acute phase in vivo. 3rd International Workshop on Humanized mice, Pittsburgh, USA, 2011年10月
- 20) Sato K., Misawa N., Nie C., Satou Y., Matsuoka M., Ito M. and Koyanagi Y. Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice. 3rd International Workshop on Humanized mice, Pittsburgh, USA, 2011年10月
- 21) Koyanagi, Y.: Humanized mouse models for HIV-1 and EBV infection. 2011 International Symposium on Infectious Disease and Signal Transduction, 台南, 台湾 2011年11月
- 22) Gee, P., Ando, Y., Kitayama, H., Yamamoto, S.P., Kanemura, Y., Ebina, H., Kawaguchi, Y., and Koyanagi Y.: APOBEC1-mediated editing and

- attenuation of HSV-1 DNA implicates an antiviral role in neurons during encephalitis. 第40回日本免疫学会, 幕張, 2011年11月
- 23) 佐藤佳, 三沢尚子, 佐藤賢文, 松岡雅雄, 伊藤守, 小柳義夫.: 急性感染期の HIV-1 増殖における制御性 T 細胞と Vpr の寄与. 第25回日本エイズ学会, WS1-006, 東京, 2011年12月
- 24) 小柳義夫.: 細胞性ウイルス抑制因子: ヘルペスウイルスとレトロウイルスの共通メカニズム 平成23年度北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会 「感染、免疫、炎症、発癌」 札幌, 2011年12月
- 25) Ebina H., Urata K., Kanemura Y. and Koyanagi Y. Construction of labeling method for nucleosome-formed viral DNA. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月
- 26) Ebina, H., Kanemura, Y., Suzuki, Y., Urata, K., Misawa, N., and Koyanagi, Y. Integrase-independent HIV-1 infection is augmented under condition of DNA damage and produces a viral reservoir. 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 2011年12月

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

図1. BST2/tetherin TM(膜貫通部)変異体解析

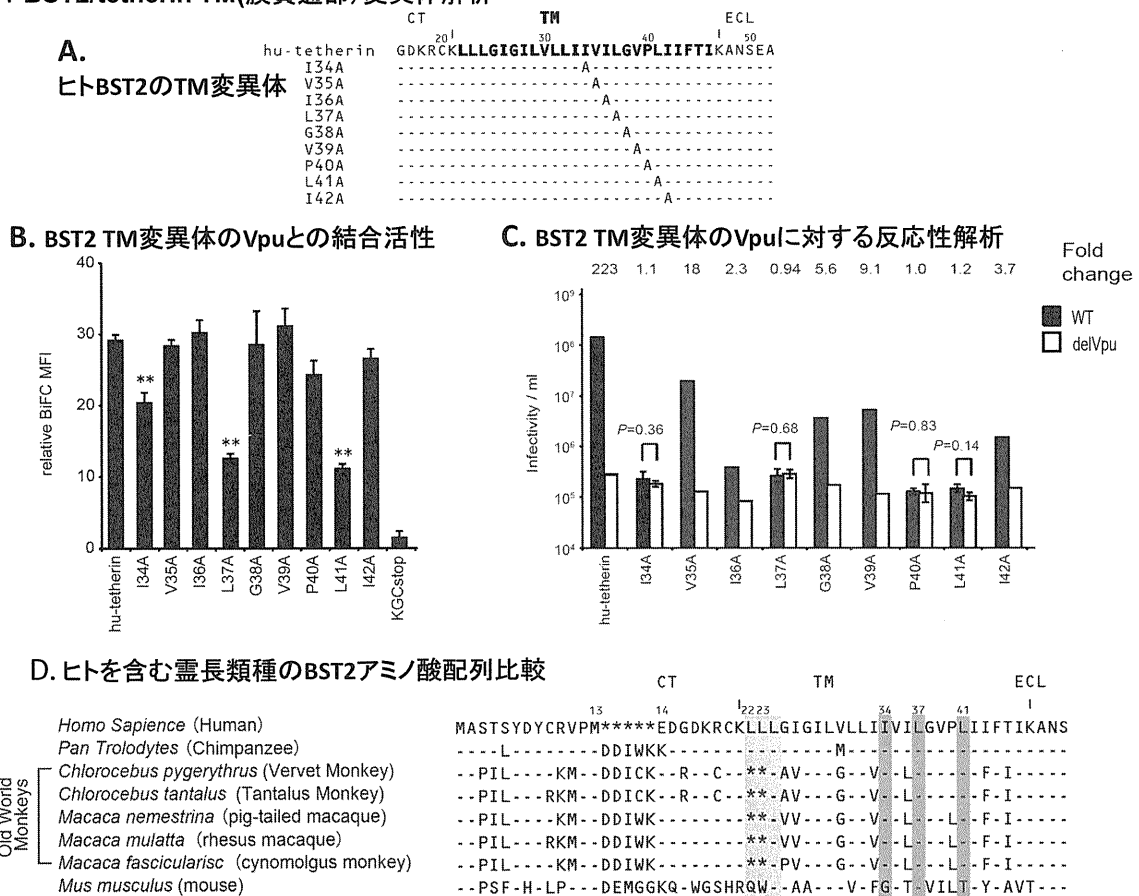
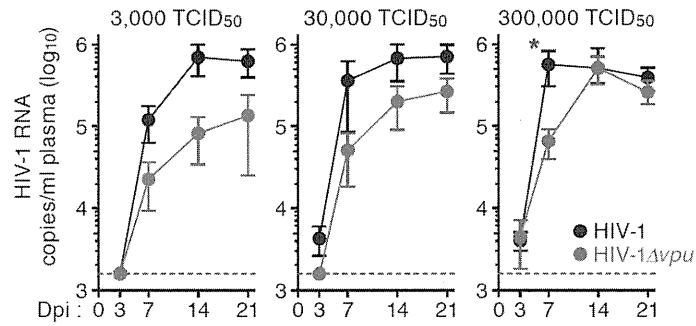


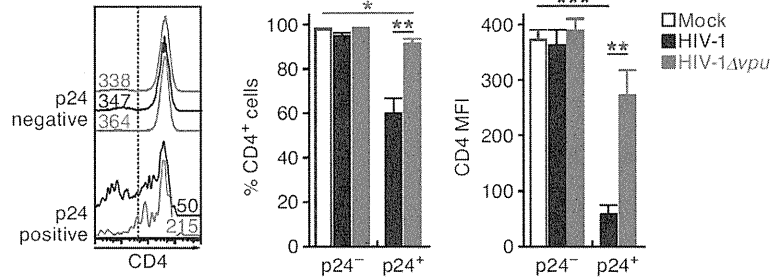
図1の説明. A. ヒトBST2 TMのアラニン置換変異体配列. B. ヒトBST2 TMのアラニン置換変異体のVpuとの結合量をBiFC法により測定した. C. BST2 TM変異体発現DNAとVpuを有する野生型HIV-1あるいはVpu欠損(delVpu)HIV-1を発現するDNAを293細胞にコトランスフェクションし、その培養上清中のウイルス量をTZM-bl細胞を用いて測定した. D. ヒト、サル類、マウスのBST2 TMのアミノ酸配列比較. CT:細胞質内領域. ECL:細胞外領域. **はP値<0.05(B)

図2. ヒト化マウスへのVpu変異体HIV-1の感染実験

A. HIV血症レベルがVpuにより増強される



B. VpuによりCD4発現はdownregulationされる



C. VpuによりBST2発現はdownregulationされる

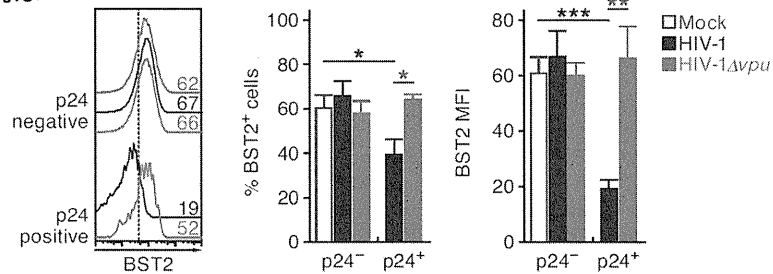


図2の説明. A. ヒト化マウスへの野生型(HIV-1)、あるいは、Vpu欠損(HIV-1 Δvpu) ウイルスを上に示したウイルス量をそれぞれ腹腔内に接種し、感染後3, 7, 14, 21日目(Dpi)に採血し、ウイルスRNA量を測定した。B. ウイルス感染後7日目に解剖し、脾臓を取り出し、CD3⁺, CD8⁺, CD45RA⁻細胞をそれぞれの抗体により染色し、さらに抗Gag p24抗体による細胞内染色により、p24⁺とp24⁻細胞群のヒストグラム(右)におけるCD4とBST2発現細胞率(中)とそのmean fluorescent intensity(MFI)(左)を算出した。

HIV-1 感染および AIDS 発症抵抗性遺伝子 *Rac2* の発現調節と作用機序

研究分担者 宮澤 正顯 近畿大学医学部 教授

研究要旨: 特定の HIV-1 感染者と継続的に非防御的な性的接触を繰り返していながら、血中に HIV-1 ゲノムも抗 HIV-1 IgG 抗体も検出されない HIV-1 曝露非感染者がある。我々は、レトロウイルス中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* をマウス第15染色体上にマッピングする過程で、これと機能的に相同なヒト遺伝子が HIV-1 曝露非感染者における抵抗性要因となっている可能性を見出し、その分子実体を追求してきた。今年度は、*Rac2* 遺伝子座の機能的ハプロタイプについて、その人種間分布を進化生物学的に解析し、イタリアとタイのコホートで曝露非感染者に集積することを見出してきたハプロタイプが、ヨーロッパ人種とアジア人種に特異的な分布を示すことを明らかにした。また、タイのコホートでは、特定の機能的ハプロタイプが HIV-1 感染成立後の病態と関連することを明らかにした。

A. 研究目的

有効なウイルス感染防御法および治療法を開発するには、自然抵抗性を示す個体群の遺伝要因を明らかにするのが早道である。HIV-1 感染の成立後に初期のウイルス複製を制御する因子として宿主 MHC 遺伝子多型の重要性が明らかにされる一方で、HIV-1 感染の成立に対し抵抗性を付与すると考えられる宿主遺伝子として、ケモカイン受容体およびそのリガンドの多型や、マクロファージ・抗原提示細胞系の機能に関与するマンノース結合レクチン、DC-SIGN などの遺伝子多型が報告されている。しかし、ケモカイン受容体発現欠損の頻度は低く、イタリア・タイ・アフリカなどで把握されてきた HIV-1 曝露非感染者 (HIV-1-exposed seronegative individuals: ESNs) の多くは、既知の遺伝子多型ではその感染抵抗性を説明できない。

我々は、マウスレトロウイルス感染時に中和抗体産生を制御する宿主遺伝子 *Rfv3* を第15染色体にマップする過程で、そのオーソログが存在すると考えられるヒト第22染色体上に ESN の原因遺伝子が存在する可能性を指摘し (Kanari, Y., et al. *AIDS* 19:1015-1024, 2005)、抵抗性遺伝子の分子実体として、昨年度までに *Rac2* インترون5の機能性多型を発見してきた。

今年度は、*Rac2* 多型が HIV-1 感染抵抗性に結びつく分子機構を引き続き解明するとともに、*Rac2* 遺伝子座の機能性多型を分子進化の面から解析し、抵抗性ハプロタイプの選択過程を明らかにすることを試みた。同時に、*Rac2* 遺伝子座の多型が、曝露非感染状態だけでなく、HIV-1 感染

成立後のエイズ病態発症経過に与える影響を、タイコホートの検体を用いて解析した。

B. 研究方法

1) *Rac2* インترون多型による遺伝子発現制御の解析

Rac2 遺伝子座のイントロン5に見出した各ハプロタイプについて、それらを単独で *luc* 遺伝子発現ベクターに挿入し、多型の見られない *Rac2* 遺伝子プロモーター存在下でのルシフェラーゼ活性を比較解析した。さらに、イントロン5の塩基多型について相互に置換を行い、発現調節に重要な多型を絞り込んだ。

2) *Rac2* インترون5及び下流非翻訳領域ハプロタイプの進化生物学的解析

Rac2 遺伝子座に見出したイントロン5及び3'非翻訳領域 (UTR) のハプロタイプについて、それらの人種間分布を、HapMap のデータとイタリア及びタイコホートの塩基配列決定データから解析した。さらに、各ハプロタイプ間のそれぞれの単一塩基多型 (SNP) における遺伝子型頻度の比較から、*Rac2* 遺伝子座全体のハプロタイプの系統樹を作製し、イントロン5と3' UTR の各ハプロタイプの相互関係を明らかにすることを試みた。

3) *Rac2* 遺伝子多型と HIV-1 感染病態との相関解析

タイ・ランパンコホートの HIV-1 感染者について、そのエンター時点での末梢血 HIV-1 コピー数及び CD4 陽性 Tリンパ球数と *Rac2* 遺伝子型との相関を、Bartlett 法で群間解析した。

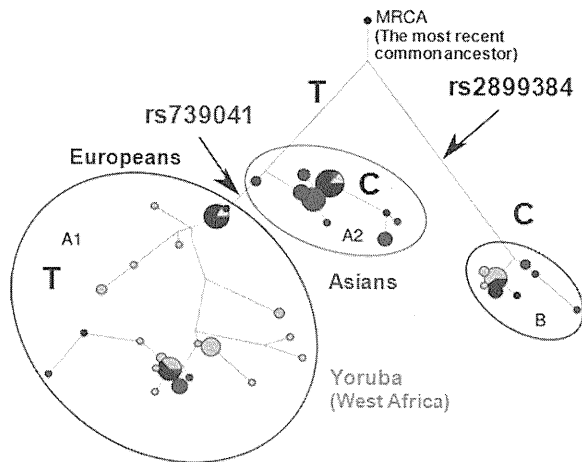


図 1: *Rac2* イントロン 5 と 3' UTR のハプロタイプと、それらの進化系統樹。 *Rac2* 遺伝子領域に見出される SNPs には、イントロン 5 と 3' UTR でそれぞれ強い連鎖不平衡があり、ハプロタイプ形成が認められる。これら各ハプロタイプは、そのヒトにおける進化系統樹から、A1, A2, B のハプログループに分けることができる。

【倫理面への配慮】

イタリアおよびタイコホートにおける *Rac2* 遺伝子領域の塩基配列多型解析は、現地病院倫理委員会の許可を受け、書面による同意の上で採取した検体を用いて実施した。連結不能匿名化試料を用いたヒトゲノム遺伝子解析の実施については、近畿大学医学部ゲノム倫理委員会より許可を得た（「新型チップ等を用いた第 22 染色体新規 SNPs 多型の網羅的解析による HIV 感染防御ワクチン及び抗 HIV 治療薬の効果判定改善と新しい免疫治療法の開発」、平成 20 年 5 月 30 日承認、19-61）。

C. 研究結果

1) *Rac2* イントロン 5 及び 3' UTR ハプロタイプの進化的生物学的解析

Rac2 遺伝子多型の形成と選択の過程を明らかにするため、機能性を持つイントロン 5 と、3' UTR の SNPs について、HapMap のデータと多数検体の塩基配列決定によるハプロタイプ解析を行った。その結果、人類の持つ *Rac2* ハプロタイプは大きく 3 つの系統分岐に分かれること、イントロン 5 に存在し、イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者に集積する高発現型のハプロタイプ T を特徴付ける SNPs の一つである rs739041 が、最近分岐した二つの枝の分かれ目を決定すること、一方 3' UTR に存在する多型により決まるハプロタイプが、より以前に分岐したハプロタイプグループを決定付けることが明らかになった（図 1）。

これらハプロタイプグループの人種間分布を

比較すると、より旧くに分岐した 3' UTR のハプロタイプグループ B は西アフリカに頻度が高く、同じ分岐のハプロタイプグループ A1 と A2 は、ヨーロッパ人とアジア人に頻度が高かった。また、イントロン 5 の多型により決定付けられる A1 と A2 のグループのうち、アジア人には rs739041 の遺伝子型が C であるハプロタイプがより多く、一方でヨーロッパ人ではこの SNP の遺伝子型が T であるものと C であるものがほぼ拮抗していた。

2) *Rac2* ハプロタイプと HIV-1 感染病態の相関

タイ・ランパンコホートの HIV-1 感染者とその非感染パートナーに関する有吉らとの共同解析により、タイではイントロン 5 に HIV-1 曝露非感染状態と相関する C2 というハプロタイプが存在することを、昨年度までに明らかにしてきた。C2 ハプロタイプに関する機能的解析から、イントロン 5 の rs4140870 に G を持つと、この SNP が A である場合に比べて遺伝子発現が有意に高まることが判明した。一方、同じランパンコホートでは、本来アジア人では頻度の低い T ハプロタイプを基礎として、そこに上記の C2 ハプロタイプと同様、rs4140870[G]の遺伝子型が加わった T2 ハプロタイプが見言い出された。

ランパンコホートの HIV-1 感染者について、エントリー時のウイルス学的及び免疫学的指標と *Rac2* イントロン 5 ハプロタイプとの相関関係を Bartlett 法で抽出したところ、上記のハプロタイプ T2 を持つ者では、これを持たない者に比べて、有意に CD4 陽性 T リンパ球数が高いことが明らかとなった ($P = 0.0003$)。

D. 考察

これまで、*Rac2* 遺伝子第 5 イントロンに高発現型のハプロタイプを持つヒト個体では、その末梢血単核球が CCR5 指向性 HIV-1 の複製に対し抵抗性を示すことを観察・報告し、siRNA を用いた *Rac2* 発現抑制実験の結果から、*Rac2* 高発現が HIV-1 共受容体である CCR5 の発現低下と CCR5 リガンドである CCL5 の発現上昇を介して、CCR5 指向性 HIV-1 の標的細胞への吸着侵入を機能的に阻害している可能性を示してきた。

我々が遺伝的解析を行ってきたイタリアとタイの HIV-1 曝露感染者コホートのうち、イタリアでは高発現型のイントロン 5 ハプロタイプ T が、曝露非感染者に有意な集積を示していたが、タイコホートでは、ハプロタイプ T の集積は認められるものの、その程度はイタリアに比べ低かった。一方、タイコホートでは、イタリアと共通の低発現型ハプロタイプ C に一塩基置換が加わり、これによって高発現型となった C2 ハプロタイプが曝露非感染者に集積

していた。

今年度行った *Rac2* ハプロタイプに関する進化生物学的解析により、ヨーロッパ人ではイントロン5の高発現型 T ハプロタイプに対応するハプロタイプグループ A1 と、低発現型 C ハプロタイプに対応するハプロタイプグループ A2 の頻度がほぼ拮抗していることが明らかとなり(図 1)、その中で高発現型 T ハプロタイプが曝露非感染者に有意に集積することが明らかとなった。一方、アジア人では元々イントロン5の T ハプロタイプを含むハプロタイプグループ A1 の頻度が低く、rs739041 の遺伝子型が C であるハプロタイプグループ A2 の頻度が高いことから、ランパンコホートの曝露非感染者に、この A2 グループに属し、しかも rs4140870 に G を持つことで高発現型となったイントロン5のハプロタイプ C2 が集積することは合理的である。

さらに、ランパンコホートではアジア人には稀な A1 グループのイントロン5ハプロタイプ T を基盤として、そこに rs4140870[G]の加わった T2 ハプロタイプが見出され、これが HIV-1 感染者における CD4 陽性 T リンパ球数高値と強く相関していた。イントロン5にこの遺伝子型を持つ場合、ハプロタイプ T と比較してもさらに遺伝子発現が高くなるものと予測され、今後この点を機能的に検定することが重要である。

E. 結論

Rac2 遺伝子座の多型について進化生物学的な考察を行い、ヨーロッパ人にはイントロン5のハプロタイプ T を含むハプロタイプグループと、イントロン5のハプロタイプ C を含むハプロタイプグループとがほぼ拮抗して存在することを明らかにした。イタリアコホートの曝露非感染者では、そのうちイントロン5のハプロタイプ T が有意に集積しており、*Rac2* の高発現が HIV-1 感染抵抗性に結び付いていると考えられた。一方、タイ・ランパンコホートでは、元々アジア人に多いイントロン5のハプロタイプ C を基盤として、これに一塩基置換が加わった結果高発現型となったハプロタイプ C2 が曝露非感染者に集積していた。

これまで、*Rac2* のイントロンハプロタイプは HIV-1 曝露非感染状態と相関することだけを示してきたが、今年度の解析により、タイ・ランパンコホートでは、比較的まれなイントロン5のハプロタイプ T に曝露非感染者に集積する C2 と同じ一塩基置換 rs4140870[G]の加わった T2 ハプロタイプが、HIV-1 感染者における CD4 陽性 T リンパ球数高値と強く相関することが明らかとなった。従って、*Rac2* の遺伝子型は HIV-1 感染抵抗性だけでなく、HIV-1 感染成立後の病態発生にも影響を

与えると考えられる。

F.健康危険情報:

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Li, J., Y. Hakata, E. Takeda, Q. Liu, Y. Iwatani, C. A. Kozak, and M. Miyazawa. Two genetic determinants acquired late in *Mus* evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathog* 8: e1002478, 2012.
- 2) Miyazawa, M., S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwara, T. Chikaishi, and M. Kato. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Retrovirology* 8 (Suppl. 2):O30, 2011.
- 3) Sironi, M., F. R. Guerini, C. Agliardi, M. Biasin, R. Cagliani, M. Fumagalli, D. Caputo, A. Cassinotti, S. Ardizzone, M. Zanzottera, E. Bolognesi, S. Riva, Y. Kanari, M. Miyazawa, and M. Clerici. An evolutionary analysis of *RAC2* identifies haplotypes associated with human autoimmune diseases. *Mol. Biol. Evol.* 28: 3319-3329, 2011.
- 4) Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. Natural killer cells recognize Friend retrovirus-infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions in vivo. *J. Virol.* 85: 5423-5435, 2011.
- 5) Hayasaka, N., K. Aoki, S. Kinoshita, S. Yamaguchi, J. K. Wakefield, S. Tsuji-Kawahara, K. Horikawa, H. Ikegami, S. Wakana, T. Murakami, R. Ramabhadran, M. Miyazawa, and S. Shibata. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in *Rgs16* knockdown mice. *PLoS ONE* 6: e17655, 2011.

2. 学会発表

- 1) Miyazawa, M., S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwara, T. Chikaishi, and M. Kato. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Frontiers of Retrovirology* 2011. Oct. 3-5, 2011, Amsterdam, The Netherlands.
- 2) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, S. Kinoshita, T. Chikaishi, H. Matsukuma and H. Kawabata. Host immune responses determine integration of either F-MuLV alone or F-MuLV plus SFFV in Friend virus

leukemogenesis. The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis. Nov. 2-5, Montpellier, France.

3) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, Y. Hakata, J. Li, E. Takeda, and C. Ishihara. Functional consequences of mouse APOBEC3 gene polymorphisms and multiple genetic factors that influence the production of virus-neutralizing antibodies in Friend virus-infected mice. The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis. Nov. 2-5, Montpellier, France.

4) Kato, M., S. Tsuji-Kawahara, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, and M. Miyazawa. Production of virus-neutralizing antibodies and protection against lethal retroviral infection in AID-deficient mice. 第40回日本免疫学会学術集会. 平成23年11月27～29日, 千葉.

5) Takamura, S., E. Kajiwara, S. Tsuji-Kawahara, T. Chikaishi, M. Kato, S. Kinoshita, M. Itoi, N. Sakaguchi, and M. Miyazawa. Infection of thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents dynamic differentiation of functional memory CD8⁺ T cells. 第40回日本免疫学会学術集会. 平成23年11月27～29日, 千葉.

H. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し