

20121001/B

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

ヒト TRIM5aによる HIV-1 産生阻害活性の誘導に必要な宿主因子の解析
(H22-政策創薬-一般-015)

平成 22 年度～24 年度 総合研究報告書

研究代表者：佐久間 龍太
東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 ウイルス制御学分野 助教

平成 25 (2013) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告書

ヒト TRIM5 α による HIV-1 産生阻害活性の誘導に必要な宿主因子の解析 ----- 1

佐久間 龍太

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 23

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 24

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総合研究報告書

ヒト TRIM5 α による HIV-1 産生阻害活性の誘導に必要な宿主因子の解析

(H22-政策創薬一般-015)

研究代表者：佐久間 龍太

東京医科歯科大学 医歯学総合研究科 ウイルス制御学分野 助教

研究要旨

旧世界ザルの宿主因子 TRIM5 α は HIV-1 の侵入と産生の両面をそれぞれ異なる機序により強力に抑制する。一方、ヒト TRIM5 α (HuT5 α) の増殖阻害活性は非常に弱いが、少なくともウイルス産生の段階で影響している。そこで、弱い抗 HIV-1 活性を増強するため、アカゲザル TRIM5 α が宿主内で利用している宿主因子・パスウェイの発見、HuT5 α への応用を目的としている。既に RhT5 α による HIV-1 産生阻害に重要な因子の候補を選定し、複数の候補因子に関して詳細な解析を行ない、RhT5 α による HIV-1 産生阻害に関わる宿主因子、及び HIV-1 の複製に重要な働きを持つ宿主因子が得られてきた。そのうち複数の因子に関して詳細な解析が進んでおり、また、候補因子群から更なる絞込みを行い有望な新規因子を同定した。

研究分担者：なし

A. 研究目的

近年 HIV-1 感染症に対する治療法として多剤を併用する HAART が大きな成果を上げている。しかしながら、HAART では生涯にわたり多くの薬剤を飲み続けなければならない、投薬状況の悪化は薬剤耐性ウイルスの出現を招く。旧世界ザル TRIM5 α が HIV-1 の感染を抑制することは良く知られていたが、研究代表者による先行研究より、アカゲザル TRIM5 α

(RhT5 α) が HIV-1 の感染のみならず増殖をも阻害することが明らかになった。(Nat Med. 2007;13(5):631-5) 侵入阻害の場合とは異なり、過剰発現させたヒト TRIM5 α (HuT5 α) は HIV-1 の増殖を阻害できなかったが、HIV-1 粒子の成熟を遅らせる事が明らかとなり、HuT5 α でも HIV-1 の増殖を阻害できる可能性が示めされた。SIV が TRIM5 α や APOBEC といった「種の壁」を乗り越えてヒトへと移ってきたことを考えると、ヒト内在性の種間バリアは強力な抗ウイルス機構と考えられ、

その一因である HuT5 α を利用し、HIV-1 感染症への対策とすることは効果的だと考えられる。本研究では種間バリアに関する学術的な意義のみならず、AIDS 発症予防・HIV-1 感染拡大の防止に応用可能な知見を得られると考えられ、その必要性は高いと言える。そこで本研究では、RhT5 α による HIV-1 の複製阻害のメカニズムを解明し、HuT5 α がなぜ HIV-1 の複製を阻害できないのかを明らかにすることを目的とし、更に得られた知見に基づき HuT5 α による HIV-1 複製阻害活性の誘導を試みる。

B. 研究方法

細胞培養

本研究に使用した接着細胞（293T 細胞、TE671 細胞、HeLa 細胞、TZM-bl 細胞、FRhK4 細胞）は DMEM（高グルコース、10%FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン含有）で、浮遊細胞（MT4 細胞、SupT1 細胞）は PRMI1620（10%FBS、ペニシリン、ストレプトマイシン含有）で維持培養した。

RNA 干渉

siRNA は主として siRNA は life technologies 社のステルスシリーズより購入した。あるいは文献上実績のあるものを合成し使用した。shRNA は pLKO vector にコードされたものを Open bio systems 社、SIGMA 社より購入した。いずれにおいても可能な限り、バリデイトされ保証が付くものを購入し、使用した。コントロールとなる siRNA、shRNA とともにヒトの mRNA をターゲットとしない

non-target のものをそれぞれコスモ・バイオ社、SIGMA 社より購入し使用した。

培養細胞への Transfection

293T 細胞、TE671 細胞は FuGene 6 (Roche) を用いたりポフェクション法にて遺伝子導入した。細胞を 60% confluent 程度の濃度で用意し、DNA 1 μ g あたり 2.5 μ l の FuGene 6 を用いて遺伝子導入した。また、HeLa 細胞は LipofectAmine LTX に Plus reagent (ともに life technologies) を追加した系でリポフェクション法にて遺伝子導入した。上記は全てメーカーマニュアル記載の方法に則って行った。

shRNA 発現レンチウイルスベクター

shRNA 導入用レンチウイルスベクターは 293T 細胞に pLKO ベース shRNA 発現プラスミドと VSV-G タンパク質発現ベクター pMD.G.、HIV-1 Gag/Pol 発現ベクター p8.91 を co-transfection することでシュートタイプウイルスとして作製した。産生されたレンチウイルスを含む培養上清は 0.45 μ m のフィルターを通過させ死細胞由来の夾雑物等を除去し、そのまま shRNA 導入へと利用した。

融合細胞の作成

融合細胞を選択する目的で TE671-LKO 細胞を作製し用いた。TE671-LKO 細胞は TE671 細胞に shRNA 導入用プラスミドのバックボーンプラスミドを用いてピューロマイシン耐性遺伝子のみを持つレンチウイルスベクターを作製し感染させ、ピューロマイシンにて選

択した細胞で、RhT5 α による産生阻害に対しては TE671 と同等の性質を持つ。同数の 293T 細胞と TE671-LKO 細胞を混和し遠心により沈殿、50% PEG/PBS にて室温で 2 分間処理した後、通常培地で一晚、選択培地で 2 日間培養したものを融合細胞として用いた。

HIV-1 の力価測定

ウイルス感染の指示細胞として TZM-bl 細胞を用いた。TZM-bl 細胞では HIV-1 が感染すると LTR をプロモーターとしてルシフェラーゼと β -ガラクトシダーゼが発現する。48-well プレートに蒔かれた 5×10^4 の TZM-bl 細胞に、0.45 μ m のフィルターを通して精製したウイルス上清 100 μ l を感染させ、24 時間後もしくは 48 時間後に細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性を測定した。なお、研究開始時は 24 時間でのアッセイを行っていたが、バックグラウンドを考慮し、SN 比を上げるために 48 時間へと延長した。感染時間の変更に伴ってリニアレンジが保存されており、結果に違いが出ないことを確認した。

免疫沈降法

293T 細胞へ RhT5 α 発現プラスミドを単独、もしくは Gag 発現プラスミドとともに transfection した。48 時間後の細胞抽出液から RhT5 α の C 末に付加した HA タグに対する抗体を用いて免疫沈降した。RhT5 α 、および共沈殿したタンパク質は 10 % SDS-PAGE にて展開し、CBB 法で染色した。

ウイルス粒子内タンパク質の 2 次元解析

RhT5 α あるいは HuT5 α 発現プラスミドと HIV-1 NL4-3 のプロウイルスプラスミドを 293T 細胞へ transfection し 48 時間後の培養上清中のウイルス濃度を HIV-1 Gag のタンパク質濃度として p24 量を ELISA にて測定した。5 μ g p24 量に相当するウイルス上清に含まれるウイルス粒子を 20%シュークロースクッション法にて密度依存的に精製・濃縮したものを BIORAD 社の 2 次元電気泳動システムにて分離・展開した。なお等電点泳動（1 次元目）は pH3-10 の等電点勾配を、2 次元目は 4-20%のグラジエントゲルを用いた。泳動後のゲルに対して CBB 染色を行い、各スポットを可視化した。

バンド・スポットからのタンパク質の同定

Gag の有無に応じて強度に変化を認めたバンド、RhT5 α の存在によって強度に増減を認めたスポットを切り出し MALDI/TOFMS 解析にて含まれているタンパク質を解析した。本解析は、バンドを切り出した後、東京医科歯科大学のコアファシリティーに依頼した。

siRNA による一過性ノックダウン

プラスミド DNA と siRNA の co-transfection には LipofectAMINE 2000 (ライフテック) を用いた。MT4 細胞、SupT1 細胞での一過性ノックダウンは shRNA 発現プラスミドを用い、その遺伝子導入には本研究で備品購入した Nucleofector-2B を利用した。それぞれ 10^6 細胞に 2 μ g のプラスミドを導入し、MT4 細胞には kit T を SupT1 細胞には kit V を用いた。

ノックダウン細胞の樹立

shRNA はレンチウイルスベクターにて標的細胞に導入、約 2 週間のピューロマイシンによる選択を経て標的の mRNA の現象を確認した。

RNA 抽出

HIV-1 産生細胞からの RNA 抽出は qiagen 社の RNeasy mini kit を用い、RNase free DNase kit と組み合わせることで、遺伝子導入時に使用した pNL4-3 の混入を排除した。

逆転写反応

得られた RNA は superscript III (life technologies) を用いて、マニュアルに従って逆転写した。

細胞のフラクショネーション

Qiagen 社の Cell compartment kit を用いて細胞質、膜、核、細胞骨格に分けウエスタンブロットへ利用した。

免疫染色法

293T 細胞に TRIM5a 変異体発現プラスミドを導入し 48 時間後に 4%PFA にて固定、TritonX-100 で処理した後に、 α -HA (3F10、Roche) を用いて染色した。二次抗体は FITC ラベルされた抗ラット抗体を用い、同時に Hoechst を用いて核を染色した。

定量 PCR 法

本研究では SYBR Green を用いた q-PCR を

採用した。本研究で使用した全てのターゲットはプラスミド上に黒クローニングし、標準曲線を引くことで実数として計測した。使用したプライマーの配列を以下に示す。

GAPDH : S: 5'-AAG GTC GGA GTC AAC GGA TT-3', AS: 5'- CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG-3'

HIV-1 US-RNA S: 5'-CTC TAG CAG TGG CGC CCG AAC A-3', AS: 5'- TCT CCT TCT AGC CTC CGC TAG TC-3'

SOCS1 S: 5'- GCA GCC GAC AAT GCA GTC T-3', AS: 5'- GAA CGG AAT GTG CGG AAG TG-3'

S3 S: 5'- CCT CCT TCT GTA GCA GCC TG-3', AS: 5'- CGC AGC TGT ACT CCA TGT GG-3'

C. 研究結果

1. 細胞融合実験による宿主因子の性質決定

RhT5 α による HIV-1 産生阻害は細胞特異性があり、その活性を支持する細胞と支持しない細胞がある。この事は HIV-1 産生阻害には RhT5 α 以外の宿主因子も必要である、もしくはある種の細胞の中では RhT5 α による HIV-1 産生阻害を抑制する因子が存在しその因子を持つ細胞、持たない細胞が存在する可能性を示す。いずれの場合であっても、その宿主因子を同定する事は HuT5 α の抗 HIV-1 活性誘導に必須であるため、その性質決定を試みた。まず RhT5 α による HIV-1 産生阻害を支持する 293T 細胞と支持しない TE671 細胞の間で融合細胞を作製した。融合細胞群にプロウイルスプラスミドと RhT5 α もしくは HuT5 α 発現プラスミドを co-transfection し、48 時間後に TZM-bl 細胞を用いて融合細胞からのウイルス産生量を測定したところ、融合細胞群は HIV-1 産生阻害を支持した (図 1)。

以降、知的財産権を考慮して因子の具体名等を伏せたまま結果を示すことが多く有ります。ご容赦ください。

2. 免疫沈降法による RhT5 α 結合因子の探索

RhT5 α はウイルス産生細胞中の Gag 前駆体の分解を誘導することでウイルス産生を阻害する。RhT5 α が Gag を分解する際に必要な宿

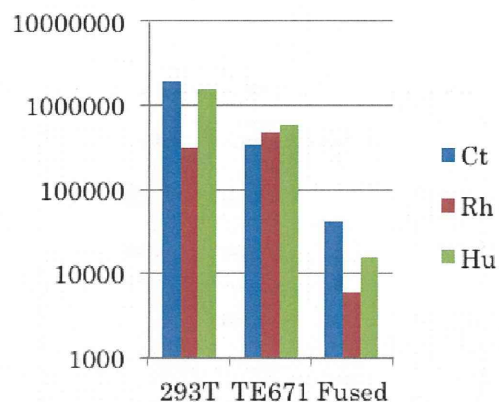


図 1 支持細胞と非支持細胞による細胞融合実験

293T 細胞と TE671 細胞を PEG により融合した後、薬剤選択した。これら融合細胞 (Fused) に HIV-1 プロウイルスプラスミドと RhT5 α 発現プラスミド (Rh)、HuT5 α 発現プラスミド (Hu)、もしくはコントロールプラスミド (Ct) を co-transfection し、48 時間後のウイルス産生量を TZM-bl 細胞を用いて定量した。PEG 融合細胞からの結果は、毎試験ごとに傾向は同じだが、測定値にブレが大きいため、複数回の試験のうち代表的な例を示す。

主因子が、Gag を分解する場合にのみ RhT5 α と結合する可能性、Gag を分解する際に RhT5 α から外れてしまう可能性を検討するため、Gag の有無で過剰発現系での免疫沈降を行い、RhT5 α と共沈殿してきたタンパク質のバンドを検出した。Gag 存在の有無によって強度の変化したバンドを切り出し、MALDI/TOFMS 解析を行った結果、CORN1C、vimentin を含む複数の候補タンパク質を同定した (図 2)。また、55 kDa 付近のバンドからは TRIM5 α が検出された。

3. 二次元電気泳動による新規因子の探索

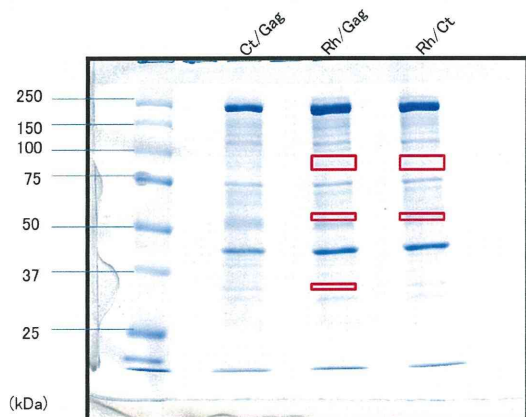


図 2 共免疫沈殿後の CBB 染色像
Gag 存在下、非存在下で RhT5 α を発現させた 293T 細胞の抽出液から抗 HA 抗体を用いて RhT5 α を免疫沈降し、沈降物を SDS-PAGE で展開、CBB 染色した像。3 回の試験のうち代表的な像を示す。赤枠で囲われた領域を切り出し MALDI/TOFMS にて解析した。Ct はコントロールとして pcDNA3.1 が、Rh は RhT5 α 発現プラスミドが Gag は HIV-1 Gag 発現プラスミドとして p8.91 を transfection したものの。

RhT5 α は HIV-1 産生を阻害するが、同時にわずかに産生されたウイルス粒子内に効率よく取り込まれる。一方 HuT5 α は粒子産生を阻害せず、HIV-1 粒子内に取り込まれない。そこで、RhT5 α が HIV-1 Gag との相互作用に宿主因子を必要とするのであれば、その因子も粒子内に取り込まれるのではないかと考えた。そこで RhT5 α 存在下、非存在下において産生された HIV-1 粒子を濃縮しウイルス粒子内に含まれるタンパク質を二次元泳動にて展開した。コントロールとして、RhT5 α 非存在下で産生されたウイルスタンパク質を抗 p24 抗体にてウエスタンブロットを行い、Gag タンパク質が過去の報告と同様に展開されていることを確認した。また、メジャースポットとなるであろうウイルス由来タンパク質の位置を確認した (図 3)。ウイルス濃縮液を展開した

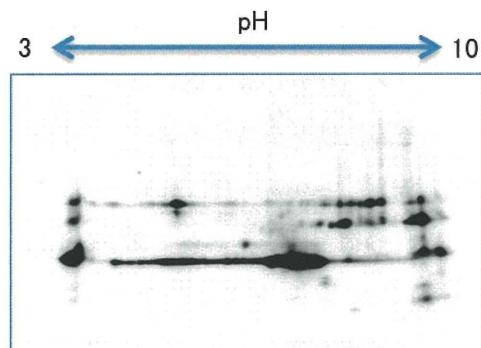


図 3 ウイルス粒子内タンパク質 2 次元展開後の抗 p24 抗体によるウエスタンブロット
293T 細胞より産生後、精製、濃縮した HIV-1 粒子、p24 量で 5 ng 分に含まれるタンパク質をを二次元電気泳動にて展開後、PVDF 膜へと転写し、抗 p24 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

ゲルは CBB で染色し、スポット強度を比較、違いの認められたスポットを切り出して MALDI/TOFMS にて解析した。(図 4) 現在までに得られた候補因子の総数は 97 個で、既に HIV-1 ウイルスタンパク質との相互作用が報告されているものが約半数の 45 種類含まれていた。また、既に粒子内への取り込みが報告されている HSP70 や TRIM5 α をウイルス粒子内より検出することに成功した。また、XRCC1 などその SNP と HIV-1 感染者における血中ウイルス量に相関が報告されている因子も同定された。

また細胞内での局在を指標に分類すると核タンパク質が約 33% と非常に多く検出された、その他出芽の場と考えられている Lipid raft 上に存在するタンパク質が約 4%、また細胞骨格形成、細胞骨格上のタンパク質輸送に関与しているタンパク質が約 14% 検出された (図 5)。更に細胞内での局在が未知なタンパク質が約 12% 検出された。同様に、宿主細胞内での既知の働きを指標に分類したところ DNA

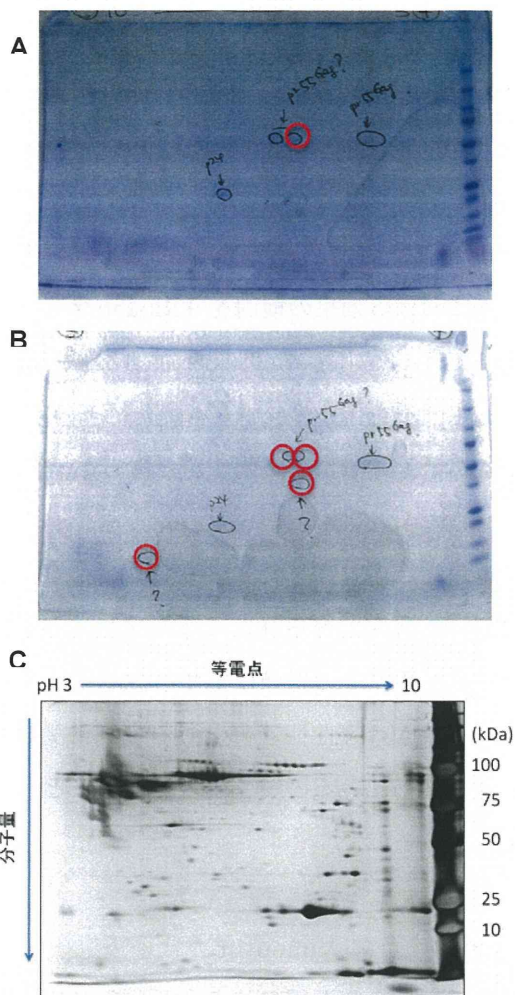


図 4 ウイルス粒子内タンパク質 2次元展開後の CBB 染色像

293T 細胞より産生後、精製、濃縮した HIV-1 粒子、p24 量で 5 ng 分に含まれるタンパク質をを 2次元電気泳動にて展開後、CBB 染色した。RhT5a 非存在下で産生されたウイルスの結果を(A)に RhT5a 存在下で産生されたウイルス粒子の展開像を(B)に示す。p24 を示すスポットと強度を比較し強度に変化の認められるスポット (赤丸) を切り出し、解析した。図 3 とは異なり図中右側から pH3-10 の等電点グラジエントとなっている。なお、スポットが薄く視認が困難であるが、ゲルを切りだしてしまい記録の撮り直しが不可能であるため、ご容赦頂きたい。(C) 再現性と視認性の向上のために行った実験結果。30 ng p24 量の精製 HIV-1 を泳動後、TOFMS に適応した銀線職を行った像。

及び RNA の結合因子、修復因子などが全体の約 40%を占めていたが、タンパク質輸送のカーゴタンパク質、シャペロン活性を持つタ

ンパク質など、HIV-1 がウイルス産生に利用していることが期待できるタンパク質も検出された (図 5)。機能面でも不明なタンパク質も約 20%同定された。この段階以降、リストの絞り込みと興味深い因子の機能を詳細に調べていくことを並行して実施した。

293T 細胞と TE671 細胞間での遺伝子発現パターンの比較

RhT5aによる産生阻害をサポートするために必要な因子を別の方法で絞り込むために、293T 細胞と TE671 細胞内のタンパク質発現パターンを比較した。HIV-1 産生時の両細胞から Total RNA を抽出し東レ株式会社のアレイ解析を依頼した。約 28000 種の解析結果より、数多くの宿主因子の発現パターンで違いが認められ 2160 個の遺伝子に関して TE671 より 293T の方が高い発現を示し、1709個では逆に TE671 での発現が高かった。更に粒子内に取り込まれていた候補タンパク質と比較し、オーバーラップするものを絞り込んだところ、16 個の遺伝子に関して TE671 より 293T の方が高い発現を示し、12 個では逆に TE671 での発現が高いということが明らかとなった。

遺伝子パターンの違いに基づくパスウェイ解析

RhT5aが HIV-1 産生を抑制するために利用しているパスウェイの同定を行うために、アレイ解析の結果差が認められた宿主因子を多く含む細胞内パスウェイを解析した。本解析も東レのアレイ解析に付随するパスウェイ解

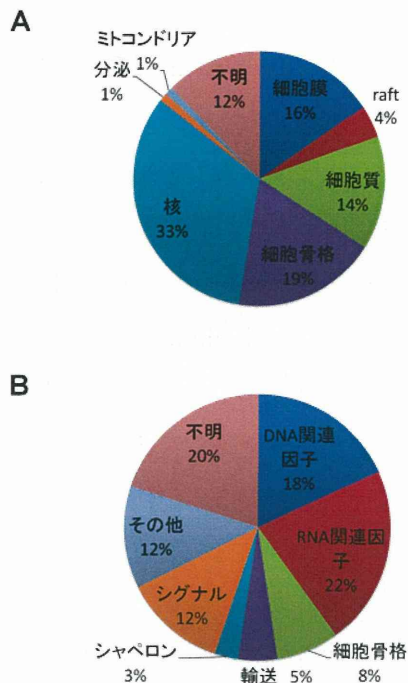


図 5 同定された候補因子の性質
細胞内での局在 (A) もしくは既知の機能 (B)
を指標に分類した。

析を利用した。脂質代謝やプロテアソームタンパク質分解系など 13 の細胞内経路に関して 293T 細胞内でより活性化傾向にあり、G1/M 期の細胞周期コントロールや DNA 修復系 16 のパスウェイでは TE671 がより高い傾向など向を示していた。これらのパスウェイに含まれる宿主因子と粒子内宿主因子を比較したところ、一部の SOCS1 や ZNF タンパク質など 6 個の粒子内宿主因子の関連が示唆された。

新規因子の HIV-1 産生に対する効果の検討
アレイ解析の結果や既知の機能から HIV-1 の増殖への関与が示唆された宿主因子群をノックダウンし HIV-1 産生への影響を調べた。29 個の shRNA をコードするプラスミドと HIV-1 プロウイルスを co-transfection し、48 時間後に培養上清中に放出されたウイルス量

を TZM-bl アッセイで定量することでノックダウン細胞からの HIV-1 産生効率を検討した (図 6)。更に得られた候補因子の新規因子の TRIM5a 抗 HIV-1 産生活性への効果の検討を行うために、同様の shRNA セットの HIV-1 産生における効果の検討を TRIM5 α 存在下において行った (図 7)。HuT5 α 強発現下で特定の宿主因子をノックダウンしたところ HIV-1 産生が低下することが明らかとなった。

同定された宿主因子の機能解析

以下、本研究で得られた具体的な宿主因子に関して、HIV-1 の増殖に対する機能・RhT5 α による HIV-1 産生阻害における役割に関して解析を進めているので、因子ごとにまとめて記載する。

CORN1C 及び Vimentin

前年度同定された因子のうち、細胞骨格、及び骨格上のタンパク質輸送に関する因子の解析を行った。CORN1C は、細胞骨格上のタンパク質輸送に関わるモータータンパク質と考えられており、その機能の多くは未知である。また、Vimentin は中間係フィラメント形成因子で、これら細胞骨格系の宿主因子群を利用して HIV-1 Gag がアセンブリの場である細胞膜直下へ移動しており、その途中で RhT5 α による攻撃を受けている可能性を考えた。

まず、CORN1C の Transient でのノックダウンには成功したものの、文献上有効な shRNA を用いても Stable なノックダウン細胞の樹立ができなかった。この結果は CORN1C の

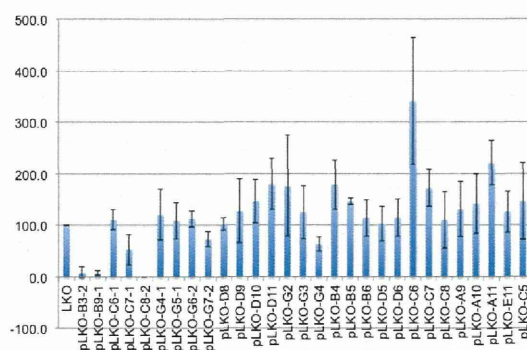


図 6 HIV-1 産生における候補因子群の関与の検討

293T 細胞に候補因子に対する shRNA 発現プラスミドと pNL4-3 を co-transfection して 48 時間後に培養上清中に産生されたウイルス力価を TZM-bl アッセイにて定量した。グラフは 3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示す。shRNA 発現プラスミドの名称は当方での管理上の番号が記されており、実際の因子名を示唆するものではない。

細胞内での働きの重要性を示唆するものであるが、HIV-1 産生における CORN1C の役割は解明できていない。この問題を解決するために SIGMA 社よりノックダウン効果の確認された別の shRNA を追加購入し、また文献上でドミナントネガティブ効果を持つとされる変異体を用いて検証すべく作製済みである。更に、候補因子として同じコロニンファミリーの CORN2A も挙げられていることから同時に検証を進めていく計画である。

Vimentin も同様にノックダウン細胞を樹立し、ウイルス産生実験を試みた。しかし、Vimentin は細胞骨格そのものであるため、ノックダウンされた細胞が接着細胞としてのフェノタイプを維持できず、HIV-1 産生を詳細に検討することができなかった。そこで、Vimentin の既知のドミナントネガティブ変異体を用いることとした。

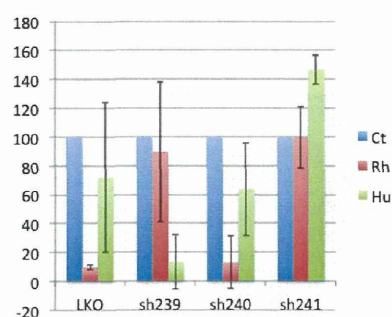


図 7 HuT5α の HIV-1 産生阻害における候補因子群の関与の検討

293T 細胞に RhT5α もしくは HuT5α 発現プラスミド、候補因子に対する shRNA 発現プラスミドと pNL4-3 を co-transfection して 48 時間後に培養上清中に産生されたウイルス力価を TZM-bl アッセイにて定量した。グラフは 3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示し、効果の認められた一部のデータを具体例として示す。Ct は TRIM5α の代わりに EGFP 発現プラスミドを用いたコントロールであり、shRNA 間での比較が可能になるよう、この結果を 100% とした。shRNA 発現プラスミドの名称は当方での管理上の番号が記されており、実際の因子名を示唆するものではない。

Vimentin は N 末端からヘッドドメイン、ロッドドメイン、テイルドメインを持ち、更にロッドドメインは 4 つのサブドメインに分かれる。ヘッドドメインとロッドの最初のサブドメインのみを過剰発現させると中間径フィラメント形成を一過的に阻害することが知られており、文献上 N 末端に GFP を融合したものが広く採用されていたため、本研究でも同じものを採用した。

過剰発現したドミナントネガティブ (DN) Vimentin 存在下で RhT5α の HIV-1 産生に対する影響を調べた。DN-Vimentin を導入すると TRIM5α の有無に関わらず HIV-1 の産生が低下した。また、DN-Vimentin 導入時、単位 p24 あたりのウイルス感染価も低下した (Fig 8B)。以上より、残念ながら RhT5α による HIV-1 産生阻害との関与は認められなかった

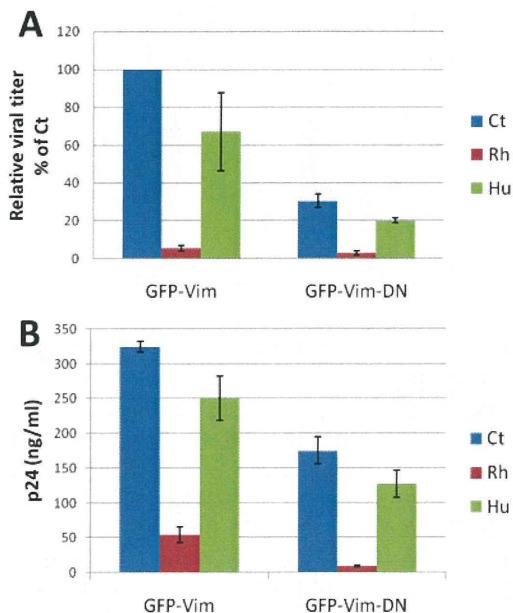


図 8 Vimentin-DN による HIV-1 産生抑制
 293T 細胞に pNL4-3、pRhT5 α -HA あるいは pHuT5 α -HA、pGFP-Vim-DN あるいは pGFP-Vim を導入した。導入後 48 時間後のウイルス産生量を TZM-bl 細胞への感染 (A) と p24 ELISA (B) を指標に解析した。■Ct は pcDNA3.1、■Rh は pRhT5 α -HA、■Hu は pHuT5 α -HA を導入した結果を示す。横軸の GFP-Vim は WT を、GFP-Vim-DN は DN を導入した結果を示す。

が、Vimentin は HIV-1 産生に重要な役割を持つことが示唆された (図 8)。

SOCS1

SOCS1 はサイトカインシグナル抑制タンパク質の 1 つであり HIV-1 Gag をライソソームでの分解から救い出すことで HIV-1 の増殖を促進する。また本研究で、HIV-1 粒子中からも検出された。

SOCS1 をノックダウンした細胞で Gag タンパク質の分解が抑制され、結果としてウイルス産生は質・量ともに回復した。そこで、SOCS1、RhT5 α 、Gag の三者の相互作用を過剰発現系での共免疫沈降法により解析した。

SOCS1 を過剰発現させることで

SOCS1・RhT5 α ・Gag の 3 者での共沈殿が認められた。またこの時、SOCS1、RhT5 α の 2 者での相互作用も認められた (図 9A)。以上から、RhT5 α が Gag の分解を誘導する過程で SOCS1 が重要な働きをしていることが示唆された。そこで、RhT5 α による HIV-1 産生阻害が起こらない TE671 細胞での内在 SOCS1 の mRNA 量を解析したところ、293T よりも最大で約 10 倍高い発現を認め、また TE671 細胞を用いると、内在の SOCS1 発現レベルで RhT5 α と Gag タンパク質の共沈殿が認められた (図 9B)。これらから、RhT5 α の抗 HIV-1 活性には内在性の SOCS1 発現量が重要であることが示唆され、HIV-1 は宿主 SOCS1 タンパク質を利用してウイルスタンパク質を安定化していることが予想された。そこで RhT5 α の抗 HIV-1 活性に対する内在 SOCS1 の役割を調べるために、SOCS1 ノックダウン細胞からのウイルス産生を観察した。TE671 細胞では、SOCS1 のノックダウンにより RhT5 α が HIV-1 の産生を阻害できるようになった (図 9C)。これらの結果より内在性 SOCS1 の発現・活性をコントロールすることで、TRIM5 α の抗ウイルス活性をコントロールできる可能性が示めされた。

SOCS1 過剰発現により産生阻害が起こらなくなるメカニズムの検討

SOCS1 がどのようにして RhT5 α による産生阻害をブロックしているのかを検討するために、RhT5 α 、SOCS1 をともに強発現している HIV-1 産生細胞内のタンパク質を解析した

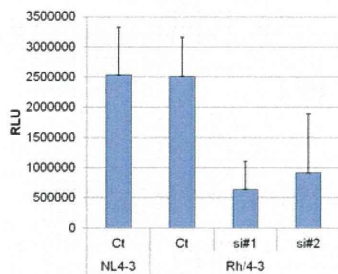
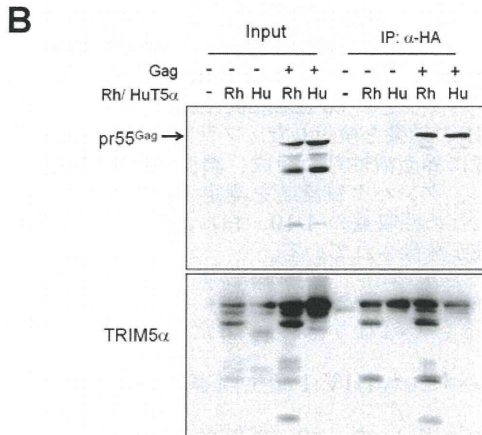
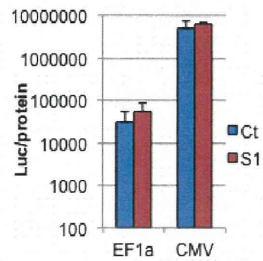
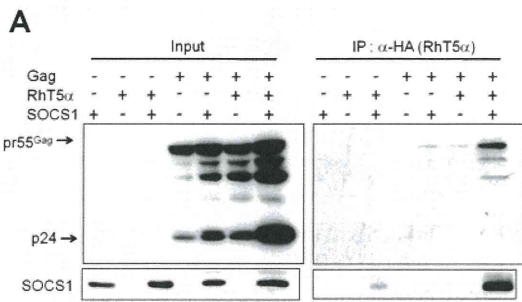


図 9 HIV-1 産生阻害における SOCS1 の効果
 (A) 293T 細胞に Gag 発現プラスミド TRIM5a 発現プラスミド、SOCS 発現プラスミドを図中に示す組み合わせで co-transfection し、48 時間後に HA (TRIM5a) を用いて IP を行った結果。左側のパネルが IP 前のインプットを右側が IP 後のタンパク質をそれぞれウエスタンブロットしたもの。(B) A と同様の実験を TE671 において行った。ただし SOCS1 発現プラスミドは用いていない。(C) TE671 に SOCS1 に対する siRNA、RhT5a 発現プラスミド、pNL4-3 を co-transfection して 48 時間後のウイルス産生を測定した結果。

ところ、SOCS1 の過剰発現によって RhT5α 量の低下を認めた。一方で HuT5α の発現量に変化は無く、CMV プロモーター、EF1α プロモーターからのルシフェラーゼの発現に影響

図 10 SOCS1 過剰発現はルシフェラーゼ活性に影響を与えない

293T 細胞に EF1α プロモーター依存 Renilla luciferase 発現プラスミドもしくは CMV プロモーター依存 Firefly luciferase 発現プラスミドを SOCS1 発現プラスミド (S1) とともに co-transfection した。コントロール (Ct) として EGFP 発現プラスミドを用いた。48 時間後に細胞抽出液を回収しタンパク質濃度、ルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性をタンパク質濃度でノーマライズし、独立した 3 回の実験結果の平均を標準偏差とともに示した。

は無かった (図 10)。更に SOCS1 は HIV-1 Gag をライソソームでの分解からレスキューするという報告があるため、SOCS1 の過剰発現によって RhT5α のタンパク質安定性に影響があり、分解が誘導されたものと考えた。そこで SOCS1 がどのような経路で RhT5α の分解を誘導しているのかを調べるためにプロテアソーム阻害剤 (MG132) にて処理したが、発現量の回復は認められなかった (図 11)。よって非プロテアソーム系での分解誘導であることが示唆された。

TRIM5α の局在に関する検討

RhT5α はプロテアソーム非依存的な Gag の分解を誘導する。NH₄Cl で処理することで RhT5α に誘導された Gag の分解が止まったように見えた一方で TRIM5α のバンドの消失を認めた。これを解析するために NH₄Cl の処理、未処理細胞のタンパク質を細胞質、膜、核、細胞骨格の 4 フラクシオンに分けて回収

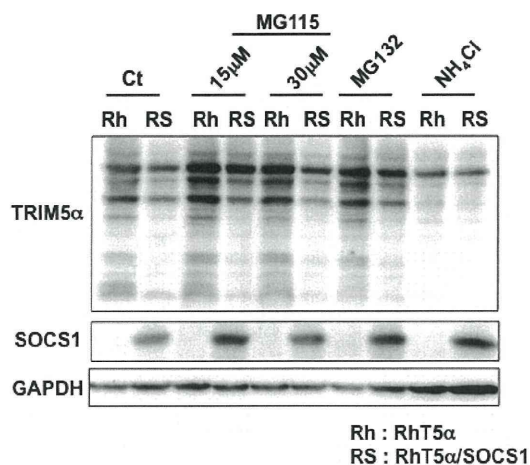


図 11 SOCS1 が誘導する RhT5α の分解はプロテアソーム非依存的である
293T 細胞に RhT5α 発現プラスミド単独 (Rh) 及び RhT5α 発現プラスミドと SOCS1 発現プラスミドの両方 (RS) を導入し、24 時間後に MG115 (15 mM, 30 mM)、MG132 (30 mM)、もしくは NH4Cl (10 mM) で処理した。Over-night の薬剤処理後、細胞を RIPA バッファーで溶解し、ウエスタンブロットにて抽出液中の TRIM5α、SOCS1 の量を解析した。なお、タンパク質濃度を測定し、各レーン 30 μg を展開し、ローディングコントロールとして GAPDH を検出した。

し、TRIM5α の局在を調べた。その結果、NH4Cl 処理によって消えたように見えていた TRIM5α は細胞骨格分画から検出され、TRIM5α 総量の減少は認められなかった (図 12)。これらの知見より TRIM5α の局在がその抗ウイルス活性に重要であることが示唆された。TRIM5α を免疫染色法で検出した場合、細胞質で粒子様の構造を形成することが知られており、サイトプラズミックボディと呼ばれる。このサイトプラズミックボディの形成能と産生阻害の間の相関を調べるために、文献上サイトプラズミックボディを形成しない変異体を作製した。また、サイトプラズミックボディの形成には TRIM5α 中のリンカー 2 領域が重要であることが知られているため、その部分をヒト化した変異体を新たに作製した。作製した変異体は低いサイトプラズミックボディ形成効率を示したが、完全に形成し

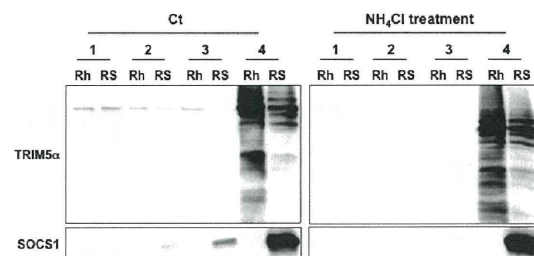


図 12 TRIM5α は細胞骨格分画から検出された 293T 細胞に RhT5α 発現プラスミドを Transfection し、24 時間後から over-night で NH4Cl 処理を行った後、細胞を cell compartment kit にて抽出、細胞質 (1)、膜 (2)、核 (3)、細胞骨格 (4) 分画に分け抽出した。Transfection は RhT5α 発現プラスミド単独 (Rh) 及び SOCS1 発現プラスミドとの co-transfection (RS) とを行い、SOCS1 の効果を検討した。フラクションを重ねていく度に界面活性剤の組成、濃度が劇的に変化するため、タンパク質濃度を測定することができなかったため回収量の 1/10、おおよそ 10⁶ 細胞分の抽出液が泳動されている。

なくなるものはなかった。また、これらの変異体はいずれも HIV-1 産生阻害活性を示した。一方で、リンカー 2 領域をヒト化した KPETFp ではサイトプラズミックボディは形成するものの HIV-1 産生阻害活性を示さなかった (図 13)。

SOCS1 の効果の種特異性の検討

HuT5a はヒト SOCS1 の過剰発現による分解誘導を受けなかった。この分解誘導が RhT5α をヒト細胞内で用いる事による副次的な効果であるのかを検討するためにアカゲザル由来 FRhK4 細胞より SOCS1 をクローニングし、その効果を検討した。ヒト、アカゲザルいずれの SOCS1 を用いた場合でも RhT5α の分解が誘導され、HIV-1 産生細胞内での Gag の量の増加を認めたことから、本研究で観察された TRIM5α の分解誘導は RhT5α に対する特異的な反応であることが示唆された (図 14)

S3 タンパク質

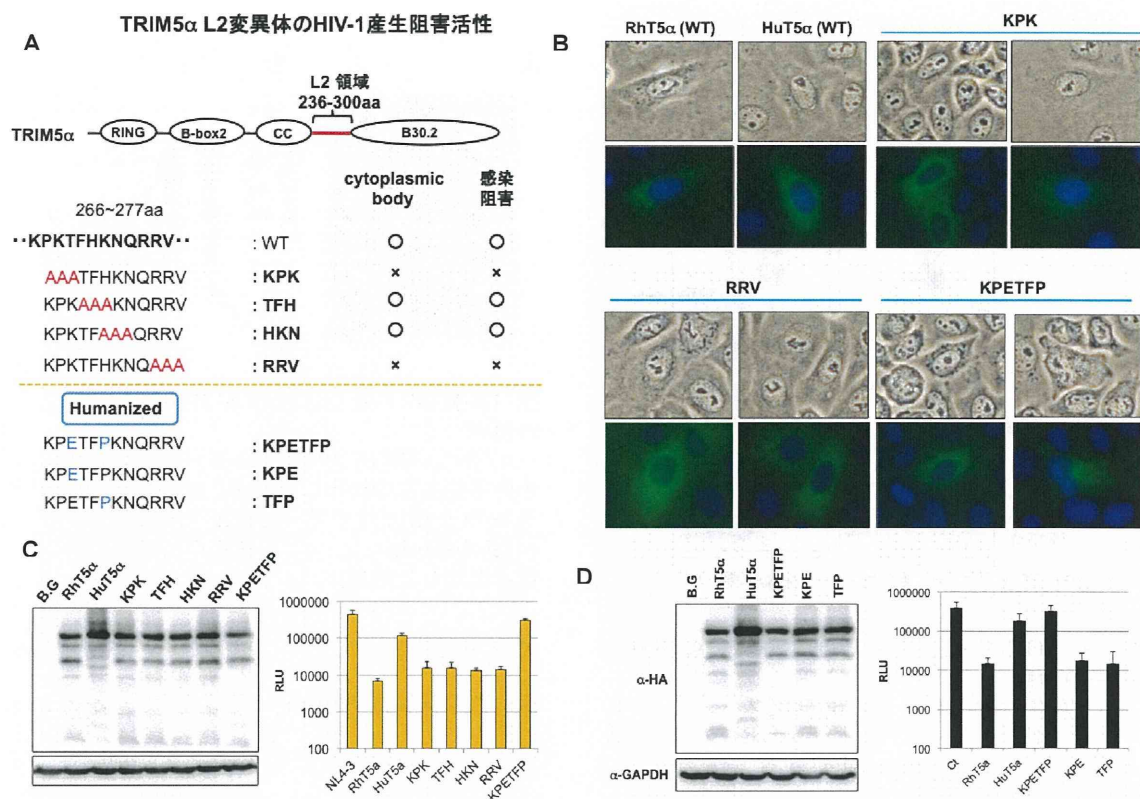


図 13 TRIM5 α サイトプラズミックボディ形成能と産生阻害の相関

(A) 本研究において作製したリンカー2 (L2) 領域の変異 RhT5 α の模式図とアミノ酸配列を示した。また文献上報告されているサイトプラズミックボディ形成能力の有無と HIV-1 侵入後阻害活性 (感染阻害) との関連をまとめた。赤字で書かれた変異体がアラニンスキャンを青字で書かれた変異体はヒト化されていることを示す。(B) 作製した変異体によるサイトプラズミックボディ形成を免疫染色で検討した。各パネル上段が明視野での観察像を、下段が UV 励起時の観察像を示す。緑が FITC ラベルされた二次抗体を用いた TRIM5 α の検出像を青がヘキストによる染色像で核を示す。(C and D) 作製した変異体の発現チェックと HIV-1 産生阻害活性を示す。アラニンスキャンによる L2 変異体 (C) とヒト化変異体 (D) を 293T 細胞に Transfection して 48 時間後の発現量をウエスタンブロットにて検出した。これら変異体発現プラスミドを pNL4-3 と co-transfection し、48 時間後の産生されたウイルス量を TZM-bl アッセイにて定量した。グラフは独立した 3 回の実験結果の平均を標準偏差とともに示す。

S ファミリーは少なくとも 4 つの宿主因子から構成されており、S1, S2, S3 は T 細胞系で発現しており、S4 の発現は認められないため、本研究では S1~3 を評価の対象とした。S1, S2 は細胞質、もしくは細胞膜表面に局在すると考えられ、機能解析も進められているが、S3 の機能・性状についての報告は殆どなされていない。これらファミリーに共通の構造的特徴から HIV-1 の増殖に関与する因子で

ある可能性を考え、まず過剰発現系でその効果を検討したところ S3 タンパク質が HIV-1 の増殖に必須な因子である事が示唆された。そこで、siRNA をもちいて内在性 S3 タンパク質の発現を抑制したところ HIV-1 産生量の低下が認められた。更なる解析の結果、S3 は核に局在し、S3 をノックダウンすることで、細胞質中の HIV-1 Gag の RNA レベルが低下することが示された (図 15)。現在のところ

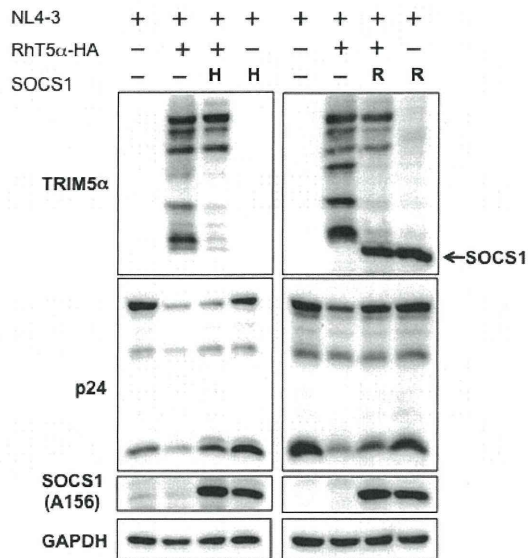


図 14 SOCS1 による RhT α 5 分解誘導の種特異性の検討

293T 細胞に pNL4-3、RhT5 α 発現プラスミド、及びヒト (H) もしくはアカゲザル (R) の SOCS1 発現プラスミドを co-transfection し、48 時間後に RhT5 α の発現量をウエスタンブロットにて解析した。なお、当初入手済みの SOCS1 抗体 (A156) がアカゲザル SOCS1 を認識するかが不明であったため SOCS1 には RhT5 α と同様に HA タグが付加されており、HA 検出ウエスタンブロットの像では同時に検出されている。また、それぞれのプラスミドを含まないコントロールの Transfection (-) では pcDNA3.1 を用いて Transfection DNA の総量を合わせている。

本因子と RhT5 α の相関を示すデータは得られていないが、S3 は HIV-1 の増殖に重要であることから新規抗ウイルス戦略の標的となる可能性が示されたため、S3 タンパク質の HIV-1 産生に対する役割の解析を進めた。

S3 タンパク質ノックダウンの効果の細胞特異性の検討

前年度までの研究結果より S3 をノックダウンすることにより HIV-1 アンسプライズド RNA (US-RNA) の量が減少することが明らかとなっていたが、HIV-1 産生細胞として 293T 細胞を用いた結果であった。そこで本来

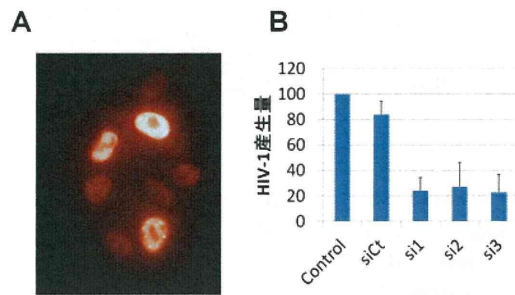


図 15 HIV-1 産生における S3 タンパク質の性状

(A) HeLa 細胞における S3 タンパク質の局在を免疫染色法で検出した。(B) 293T 細胞に S3 タンパク質に対する siRNA と pNL4-3 を co-transfection し、48 時間後のウイルス産生量を測定した結果。

の宿主細胞により近い T 細胞由来培養細胞を用いて同様の結果を得ることができるのかを検討した。MT4 細胞を用い、また細胞株による選択性を検討するために、293T 細胞と同様に接着細胞である HeLa 細胞を用いた。MT4 細胞では siRNA 導入では S3 タンパク質をノックダウンすることができず、また shRNA 発現ウイルスベクターの感染でもノックダウンを認めなかった、一方で Nucleofector を用いた shRNA 発現プラスミドの導入によって S3 タンパク質のノックダウンに成功した。用いた全ての細胞において 293T 細胞と同様の結果を得たため、S3 タンパク質は HIV-1 のウイルス産生に重要であることが強く支持された (図 16)。今回、SupT1 細胞を用いた検討を試みたが、本研究に用意した全ての shRNA において transfection 後に S3 タンパク質 mRNA レベルの上昇を認めたため、実験に用いることができなかった。また、TE671 細胞ではノックダウン後速やかに細胞が死んでしまい、ノックダウン細胞からのウイルス

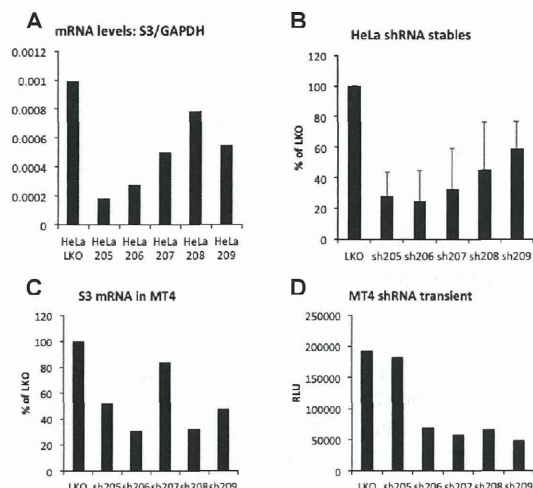


図 16 S3 タンパク質ノックダウンの HIV-1 産生における効果の細胞特異性の検討

(A) HeLa 細胞を用いて樹立した S3 ノックダウン細胞で発現している S3 タンパク質のレベルを検討した。タグを持たない S3 タンパク質を検出可能な抗体は入手したが、内在性の S3 タンパク質は検出できないものであったため、発現量は mRNA 量として示した。S3 の mRNA は逆転写後、定量 PCR で測定し、同じサンプルに含まれる GAPDH の mRNA レベルによってノーマライズした。(B) S3 ノックダウン HeLa 細胞に pNL4-3 を Transfection し 48 時間後に培養上清中に産生されたウイルス力価を TZM-bl 細胞を用いて定量した。グラフは独立した 3 回の実験結果の平均を標準偏差とともに示した。(C) MT4 細胞におけるノックダウン試験の結果。MT4 細胞では shRNA 発現プラスミドを nucleofection することで、一過性の S3 ノックダウンに成功した。Nucleofection の 48 時間後に細胞の Total RNA を抽出、S3 タンパク質の mRNA は逆転写後、定量 PCR で測定し、同じサンプルに含まれる GAPDH の mRNA レベルによってノーマライズした。(D) Nucleofection により S3 に対する shRNA 発現プラスミドと pNL4-3 を co-transfectin した。48 時間後に培養上清中に産生されたウイルスの力価を TZM-bl 細胞にて定量した結果を示す。なお、(C) と (D) は同じ実験から得たサンプルであり、複数回の実験により同様の傾向が得られているが、nucleofection の効率によって実験ごとに数値のばらつきが大きいため代表的なデータを記載した。

回収を行うことができなかった。

LTR プロモーター活性に対する影響

まず、S3 タンパク質が LTR のプロモーター

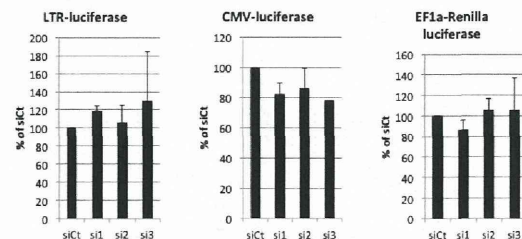


図 17 S3 ノックダウンの効果はプロモーターに依存しない

293T 細胞にレポーターとして LTR、CMV プロモーター依存 Firefly luciferase 発現プラスミド、もしくは EF1a プロモーター依存 Renilla luciferase 発現プラスミドを、またエフェクターとして S3 タンパク質に対する siRNA (si1、si2、si3) を co-transfection した。48 時間後に Transfection された細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性は細胞抽出液のタンパク質濃度を用いてノーマライズした後、コントロール siRNA (siCt) を用いた結果を 100% として、プロモーター間での比較ができるように計算した。グラフは 3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示す。

活性に関与する可能性を検討した。また、LTR に限らず一般的な転写因子として働いている可能性を考え、CMV プロモーター、EF1 α プロモーターに対する影響も同時に調べることとした。LTR、CMV プロモーター、EF1 α プロモーターの下流にルシフェラーゼを挿入したレポータープラスミドと S3 に対する siRNA を co-transfection して 48 時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。用いたレポータープラスミドは LTR、CMV からは Firefly luciferase を、EF1 α からは Renilla Luciferase を発現する。いずれのプロモーターを用いた場合でも、S3 のノックアウトによってルシフェラーゼ活性の有意な低下は認められなかった (図 17)。以上より US-RNA の減少は転写開始後に起こる反応であることが示唆された。

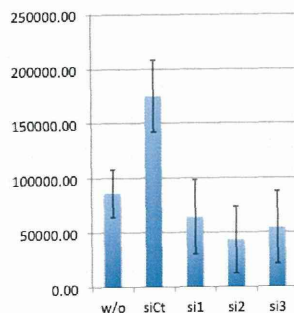


図 18 S3 タンパク質ノックダウンの Tat 活性に対する効果の検討

293T 細胞に LTR 依存 Firefly luciferase 発現プラスミドと Tat 発現プラスミドを S3 タンパク質に対する siRNA (si1, si2, si3) もしくはコントロール siRNA (siCt) と co-transfection した。48 時間後に transfection された細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性は細胞抽出液のタンパク質濃度を用いてノーマライズした後、3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示した。Tat によるルシフェラーゼ発現のバックグラウンドとして Tat の代わりに EGFP 発現プラスミドを用いた (w/o)

Tat に対する影響の検討

HIV-1 LTR をプロモーターとする転写は HIV-1 の調節因子である Tat の働きで伸長する。そこで Tat の機能に S3 が必要である可能性を考え Tat 強発現下でのレポーターアッセイを行った。Tat による伸長反応をモニターするために LTR から転写が開始され、3' 末側、Nef のフレームにルシフェラーゼをコードする NL-Luc をレポーターとして用いた。コントロール siRNA を用いた場合、Tat の効果によりルシフェラーゼ発現量は上昇したが、S3 タンパク質をノックダウンすると Tat を過剰発現させた場合でもルシフェラーゼ活性が Tat 非存在下と同程度まで抑えられた (図 18)。よって Tat の機能に影響を持つことが示唆された。

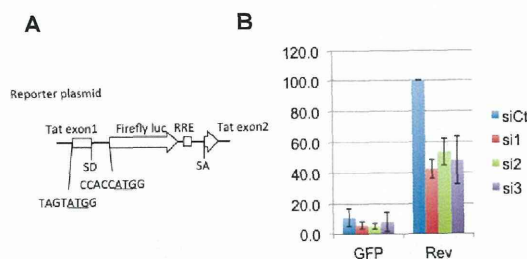


図 19 S3 タンパク質ノックダウンの Rev 活性に対する効果の検討

(A) 作製した Rev レポーターコンストラクトを図示した。レポータープラスミドは pcDNA3.1 のマルチクローニングサイトに NL4-3 の Tat をコードする領域をイントロンごと挿入したもののイントロン内部を改変し firefly luciferase を挿入した。この際、NL4-3 由来の RRE は残してある。また、Tat ATG の上流には Kozak 配列が無く、luciferase ATG は Kozak 配列を持つ。コンストラクト上のスプライスドナー、アクセプターの組み合わせは NL4-3 Tat のものをそのまま利用した。(B) 作製したレポータープラスミドと Rev 発現プラスミドを S3 に対する siRNA (si1, si2, si3) もしくはコントロール siRNA (siCt) とともに 293T 細胞に co-transfection した。Rev で活性化されないコントロールとして、EGFP 発現プラスミドを用いた (GFP)。48 時間後に Transfection された細胞内のルシフェラーゼ活性を測定した。得られたルシフェラーゼ活性は細胞抽出液のタンパク質濃度を用いてノーマライズした後、3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示した。

Rev の機能に関する影響の検討

HIV-1 US-RNA はウイルス由来の調節因子 Rev の働きによってスプライスを受けないまま核外へ輸送される。Rev は HIV-1 RNA 上、Env の ORF 中に存在する rev responsible element (RRE) を認識し、RRE を持つ RNA の安定性を上げることが知られている。前項で用いたレポータープラスミドから転写される RNA には RRE が含まれているため、Rev の影響を無視することはできない。そこで、Rev の効果を観察するためのレポーター実験系を過去の文献を参考に構築し、Rev の機能に関する S3 タンパク質の役割を解析した。作製したレポーターは CMV プロモーターの

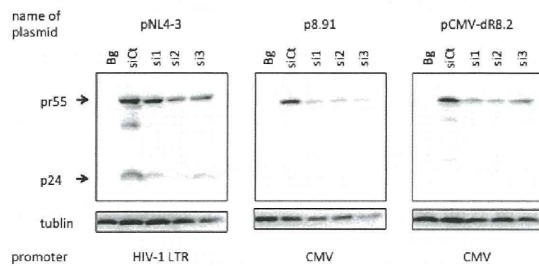


図 20 Gag タンパク質発現におけるプロモーター非依存的な S3 タンパク質の効果

293T細胞にpNL4-3、p8.91もしくはpCMV-dR8.2を S3 タンパク質に対する siRNA とともに co-transfection し 48 時間後に Gag の発現量をウェスタンブロット法にて検出した。p8.91、pCMV-dR8.2 はともにレンチウイルスベクター作製時のヘルパープラスミドとして用いられているもので、CMV プロモーター依存の HIV-1 タンパク質発現を示し、ともに Env を発現しない。バックグラウンドコントロールとして Transfection されていない 293T 細胞の抽出液が展開されている (Bg)。なお、タンパク質濃度を測定し、各レーン 30 mg を展開し、ローディングコントロールとして GAPDH を検出した。

下流に HIV-1 Tat のエクソン 1、イントロン、エクソン 2 を持ち、イントロンの内部にルシフェラーゼを挿入した。また、RRE は元々 HIV-1 Tat のイントロン中に存在し、それを利用している (図 19)。このレポーター系を用いると Rev 非存在下では Tat が発現し、Rev 存在下でのみルシフェラーゼが発現する。このとき siRNA の co-transfection によって S3 タンパク質の発現を抑制すると、レポーター由来の Rev の働きが 50 %程度まで抑制される事が分かり、Rev の働きに重要な因子である可能性が示唆された (図 19)。

プロモーター非依存的な作用の検討

S3 タンパク質の影響が Tat、Rev とともに示されたため、プロモーター、RNA 配列のどちらにより強く依存しているのかを検討するため

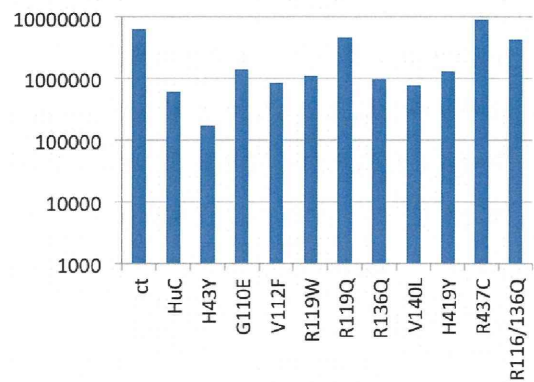


図 21 HuT5α SNP による HIV-1 産生阻害活性の比較

293T 細胞に各 SNP を持つ HuT5α の発現プラスミドと pNL4-3 を co-transfection 後、48 時間で培養上清中に産生されたウイルス力価を TZM-bl アッセイにて定量した。グラフは 3 回の独立した実験結果の平均を標準偏差とともに示す。レーンの名称は導入された SNP の残基番号と置換前後のアミノ酸を一文字表記で示しており、HuC は野生型の HuT5α を用いた際の結果を、Ct は TRIM5α 非存在下での HIV-1 産生量を示す。

に、CMV プロモーターの下流に HIV-1 の RNA の大部分がコードされたヘルパープラスミドからの Gag 発現における S3 タンパク質ノックダウンの効果を検討した。siRNA による S3 タンパク質のノックダウンによって、プロウイルスプラスミドからの Gag 発現が低下し、同様に 2 種のヘルパープラスミドからの Gag 発現の低下を認めた (図 20)。これらの結果より S3 タンパク質の役割は RNA の配列に依存することが示唆された。

既知の HuT5α SNP の持つ抗 HIV-1 活性の検討

本研究の最終目的は HuT5α の持つ弱い抗 HIV-1 活性の増強であり、ヒトの TRIM5α には複数の SNP が存在することが知られているため、それぞれの抗 HIV-1 活性について検

討を行った。既報のヒト TRIM5 α SNP 11 種を PCR による点変異導入法で作製し、それぞれの発現を確認した後に HIV-1 産生阻害活性を検討した (図 21)。その結果、ヒト TRIM5 α 間でも抗ウイルス活性に強弱が存在し、H43Y を持つものの抗ウイルス活性が最も高いことが示された。

D. 考察

プロテオミクス解析より得られた宿主因子群には、ウイルス粒子内に取り込まれる事が明らかになっているもの、ウイルスタンパク質と相互作用することが明らかになっている宿主因子が含まれており、ウイルス粒子内タンパク質の同定方法として信頼性の高い方法と考えられる。また、現在のところ HIV-1 のライフサイクルとの関連が未知の因子も多数含まれており、新規抗ウイルス戦略開発、新規抗ウイルス薬開発の標的が含まれている事が期待できる。

しかしながらプロテオミクス解析から得られた候補因子は 97 種と多く、網羅的な解析には時間を要してしまう。そこで、更なる絞り込みのために 293T 細胞と TE671 細胞の mRNA 発現量のアレイ解析の結果を利用した。残念ながら予算と期間の関係上、条件を検討しながらの複数回のアレイ解析を行うことができなかったため、アレイの結果そのものの再現性はとれていない。しかしながら本研究ではおおよそ 10^7 細胞から抽出した RNA の一部をアレイに用いているため、特殊な状況の特殊な細胞による影響を反映しているとは考え

にくい。またアレイによる差を結果とするのでは無く、粒子内取り込みを認めた宿主因子とのオーバーラップとして評価することで宿主因子群に対して多面的に評価を行っており、候補因子絞り込みの方法としては有効であると考えている。更に今回絞り込みを行い用意した shRNA の中には TRIM5 α による HIV-1 産生阻害に影響を及ぼすものが含まれていたことから、本研究で行ったスクリーニングの結果得られた候補因子群は有用なものであると考えられる。

293T 細胞と TE671 細胞の PEG による融合実験では、融合細胞の性質上、各細胞がどのような割合で 293T 由来 TE671 由来の染色体を保持するかを同定することが困難であるため、単一細胞を株化するのではなく融合細胞群として実験に用いた。融合細胞群は TE671 細胞側に導入したピューロマイシン耐性遺伝子を用いて選択することで、非融合細胞の存在を最低限に抑えたが、非融合 TE671-LOK 細胞の混入はさけられず、産生抑制効果は小さく観察されている事が考えられるが TE671 細胞に抑制因子が存在した場合、全ての融合細胞が RhT5 α による HIV-1 産生阻害を支持しない結果となる事から、図 2 の結果は「293T 細胞内に RhT5 α による HIV-1 産生阻害に必須の宿主因子が存在する」という可能性を強く支持した。

共免疫沈殿による解析では、強発現下での免疫沈降法であるため侵入のステップと産生のステップを区別する事ができないが、