

## HIV 潜伏・再活性化に関する ウイルス蛋白と宿主因子の分子機構

研究分担者 徳永 研三 国立感染症研究所感染病理部 主任研究官  
研究協力者 張 延昭 国立感染症研究所感染病理部 研究生

**研究要旨：** 2011 年に発見された抗ウイルス宿主因子 SAMHD1 はマクロファージや樹状細胞において機能し、HIV-2/SIV Vpx 蛋白により不活化される。今回我々は、それらの細胞において I 型インターフェロン (IFN) 処理後に認められる強力な抗 HIV-1 活性が Vpx によって解除できない事を見出した。つまり SAMHD1 非依存的な感染抑制を担う I 型 IFN 誘導性遺伝子 (ISG) の関与が示唆されたことから、これを探索することを目的とした。健常人の血液から調製した活性化 T リンパ球、マクロファージ及び樹上細胞を IFN $\alpha$  存在下/非存在下で培養した後に抽出した RNA を用いて、リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。その結果、6 種類の ISG が IFN $\alpha$  処理により特に著しい発現上昇を示した。これらの発現ベクターを構築して過剰発現細胞を作製し、HIV-1 感染実験を行ったところ、これら ISG は異なるレベルで HIV-1 感染を抑制することが明らかになった。以上のことから、先頃報告された新規抗ウイルス宿主因子 MX2 のみならず、これら複数の ISG が同時に HIV-1 感染を負に制御している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

マクロファージ及び樹状細胞は HIV の潜伏感染及び再活性化において鍵となる標的細胞である。そうした細胞における抗ウイルス宿主因子として、2011 年に SAMHD1 が同定され、この蛋白が細胞内 dNTP プールを枯渇することで、HIV-1 の逆転写が阻害されることが明らかになった。この阻害活性は HIV-2/SIV アクセサリー蛋白 Vpx によって抑制されるが、我々は本年度の研究において、マクロファージ及び樹状細胞の I 型インターフェロン (IFN) 処理による著しい HIV-1 感染抑制は Vpx 存在下でも解除されない事を見出した。つまり、SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制効果が考えられたことから、I 型 IFN 誘導性遺伝子 (ISG) の同定を試みることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1. 発現プラスミド DNA の構築

後述のリアルタイム RT-PCR 実験による発現

解析において候補に挙げられた 6 種類の蛋白について HeLa 細胞から抽出したトータル RNA より作製した cDNA をもとに PCR を行い、各フラグメントを C 末 HA タグ付加 pCAGGS に組込んで各発現ベクターを構築した。

#### 2. 初代培養細胞の調製

健常人 4 人の血液から Ficoll 遠心法により末梢血リンパ球を分離した後、抗 CD14 抗体磁気ビーズを用いた MACS カラム法により CD14 陽性細胞を分離した。その半分を MCSF 存在下で 1 週間培養することによりマクロファージに、残り半分を GM-CSF と IL-4 存在下で 1 週間培養することにより樹状細胞にそれぞれ分化させた。CD14 陰性細胞については抗 CD4 単クローン抗体を用いて CD4 陽性細胞を分離して、PHA/IL-2 存在下で 3 日間、刺激培養して活性化 T リンパ球を調製した。マクロファージ、樹状細胞、及び活性化 T リンパ球をそれぞれ IFN $\alpha$  存在下/非存在下で 24 時間培養した後、以下の感染実験、あるいはリアル

タイム RT-PCR 実験にそれぞれ用いた。

### 3. 感染実験

上記で調製した初代培養細胞を用いる感染実験では、まず Vpr/Vpx 融合型発現ベクター(または空ベクター)と Vpr/Env 変異型ルシフェラーゼレポーター-HIV-1 プロウイルス DNA および水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターをヒト胎児腎細胞 293T 細胞へコトランスフェクションした。48 時間後に上清中の p24 量を測定して感染を行い、更に 48 時間後に細胞溶解液を調製した。それをを用いてルシフェラーゼ活性を測定して感染性を定量化した。また候補蛋白を強制発現させる感染実験では、標的細胞用に 6 種類の候補蛋白の哺乳類細胞発現ベクターを CD4/IRES/CCR5 発現ベクターと共に 293T へコトランスフェクションした。同時にウイルスの調製のために、HIV-1 ADA 株由来 R5-Env 発現ベクター及び Env 変異型ルシフェラーゼレポーター-HIV-1 プロウイルス DNA 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 p24 量を測定した。候補蛋白と CD4/CCR5 発現細胞を撒き直した後、R5-Env シュドウイルスを感染、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### 4. リアルタイム RT-PCR 実験

前述の健常人 4 人の活性化 T リンパ球、マクロファージ、樹状細胞、または 293T 細胞、単球細胞株 THP-1 をそれぞれ IFN $\alpha$  処理/未処理したものからトータル RNA を単離した。段階希釈したコントロール (GAPDH) 及び標的遺伝子のスタンダードプラスミドとそれぞれのプライマーを用いてリアルタイム RT-PCR を行い、標準曲線の直線性を確認した後、各検体における各遺伝子の発現レベルを定量した。

[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 25 年 9 月 13 日付け承認番号・機 25-53 により、また大臣確認 (平成 25 年 9 月 20 日、大臣確認通知番号 25 受文科振第 1849 号)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. IFN $\alpha$ 処理による HIV-1 感染抑制は SAMHD1

### 非依存的である

今回まず我々は、分化させた単球細胞株 THP-1 および単核球由来マクロファージにおいて IFN $\alpha$  処理後に HIV-1 感染が強く抑えられることを確認した。その際の SAMHD1 発現レベルを測定した結果、マクロファージにおいては IFN $\alpha$  処理による有意な発現上昇が見られなかった。更に重要なことに、IFN $\alpha$  処理による THP-1 細胞、樹状細胞、マクロファージでの著しい HIV-1 感染抑制は Vpx 存在下でも解除されなかった。このことから、SAMHD1 非依存的な抑制効果が考えられ、未知の抗ウイルス宿主因子の関与が示唆された。

2. IFN $\alpha$  は幾つかの ISG 発現を強力に誘導する IFN 誘導性の新たな抗ウイルス宿主因子を探索する為にまず、活性化 T リンパ球、マクロファージ、及び樹状細胞における、各主要抗ウイルス宿主因子、または過去に報告されている数種類の IFN 誘導性因子の mRNA 発現を解析した。まず APOBEC3G と BST-2/tetherin については、活性化 T リンパ球では IFN 誘導による顕著な上昇が認められなかったが、樹状細胞とマクロファージでは、3 倍以上の発現上昇が見られた。TRIM5 $\alpha$  は全ての細胞において弱い発現上昇が確認された。これに対し、SAMHD1 の場合樹状細胞とマクロファージにおいて僅か 2 倍程度の上昇しか認められなかった。近年新たな抗ウイルス宿主因子として報告された MOV10 と、APOBEC3A は IFN 刺激による発現上昇が確認された。特に、APOBEC3A は 50-1,000 倍の発現上昇が認められた。更に過去に報告がある既知の 15 種類の ISG の発現変化を調べた。逆転写を阻害する RTF1、CTR9、PAF1 ; インテグレーションを阻害する CDKN1A、SETB1 ; そして RNA export を阻害する SLFN11 では、顕著な発現上昇が見られなかった。アセンブリを阻害する CNP 及び HERC5 では発現上昇が確認された。転写を阻害する TRIM19 と機能不明の TRIM11 の場合も、弱い発現上昇が見られた。ウイルス放出を阻害する TRIM22、RSAD2 と ISG15、更にウイルス蛋白発現およびエントリーの両ステップを阻害することが報告されている IFITM ファミリー蛋白 (1、2、及び 3) は、いずれもマクロファージにおいて IFN 誘導によ

り、25 倍から 1000 倍までの激しい発現上昇が確認された。

### 3. ISG の過剰発現は HIV-1 感染を抑制する

上記の結果より、IFN 誘導後に激しい発現上昇が確認された ISG 6 種類の発現ベクターを構築し、CD4/CCR5 発現ベクターと共に 293T 細胞にコトランスフェクションして標的細胞を作製した。R5 エンベロープを持つ Luc ウイルスを 293T 細胞から作製し、ターゲット細胞に感染させ、各 ISG の過剰発現による HIV-1 の感染抑制効果を検証した。まずウエスタンブロットにより各 ISG が正常に発現している事を確認した。これらを過剰発現させた細胞に対して HIV-1 感染実験を行った結果、APOBEC3A、IFITM ファミリー、RSAD2 は異なるレベルで HIV-1 感染を抑制することが明らかになった。

## D. 考察

IFN $\alpha$  処理をしたマクロファージ及び樹状細胞では SAMHD1 の発現上昇は認められず、また Vpx の有無に依らず HIV-1 感染が成立しないことから、SAMHD1 以外の未知の宿主因子が HIV-1 感染前期段階を強力にブロックしている可能性が示唆された。その責任因子として、昨年末に、新規宿主因子 MX2 が IFN 誘導性の HIV-1 感染抑制因子であることが Nature に 2 報連続で報告された (Nature 502:559-62, 2013, Nature 502:563-6, 2013)。しかしながら、その論文における MX2 のノックダウン実験では感染回復率は僅か 20%に過ぎなかった。したがって今回、我々の実験において、IFN 処理による大幅な発現上昇が認められ、強い HIV-1 感染抑制効果を示した APOBEC3A、IFITM ファミリー及び RSAD2 蛋白も、この感染制御に関与している可能性が考えられる。我々は現在、更なる未知の宿主因子が IFN 誘導性の HIV-1 感染抑制に関わる可能性を考慮して、cDNA ライブラリー発現レンチベクターを作製して、抗 HIV-1 活性を持つ ISG の同定を試みている。

## E. 結論

(1) IFN $\alpha$  によるマクロファージ及び樹状細胞での強力な抗 HIV-1 活性は、SAMHD1 の発

現上昇のためではなく、Vpx による解除もできないことから、SAMHD1 非依存的な感染抑制を担う宿主因子の関与が示唆された。

(2) IFN $\alpha$  処理による既知の ISG 群の mRNA の発現変動をリアルタイム RT-PCR により検討したところ、6 種類の遺伝子において顕著な発現上昇が確認された。

(3) 上記 ISG を過剰発現させた細胞に対する感染実験を行った結果、APOBEC3A、IFITM ファミリー及び RSAD2 蛋白が HIV-1 感染抑制効果を示した。

(4) マクロファージ及び樹状細胞においては、先頃報告された新規宿主因子 MX2 に加えて、SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制を担う ISG が複数存在する可能性が考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

論文発表

- 1) Koyama, T., Sun, B., Tokunaga, K., Tatsumi, M., and Ishizaka, Y.: DNA damage aids HIV-1 infection of macrophages by overcoming integrase inhibition. *Retrovirology* 10:21, 2013.
- 2) Chutiwitoonchai, N., Hiyoshi, M., Hiyoshi-Yoshidomi, Y., Hashimoto, M., Tokunaga, K., and Suzu, S.: Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins. *Microbes Infect.* 15:280-290, 2013.
- 3) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Tanaka, Y.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. *J. Cell Sci.* 126:2798-2809, 2013.
- 4) Tada T., Kadoki, M., Liu, Y., Tokunaga, K. (co-corresponding author), and Iwakura, Y.: Transgenic expression of the human LEDGF/p75 gene relieves the species barrier against HIV-1 infection in mouse cells. *Front. Microbiol.* 4:377, 2013.
- 5) Koyama, T., Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama,

M., Fujita, H., Sato, H., and Tokunaga, K. (corresponding author): APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of both Alu and LINE-1 retrotransposition. PLoS ONE 8:e84228, 2013.

#### 学会発表

- 1) Fujita, H., Iwabu, Y., Tokunaga, K., Tanaka, Y.: MARCH8 mediates the ubiquitination and lysosomal degradation of the transferrin receptor. The 35th Naito Conference: “The Ubiquitin-Proteasome System: From Basic Mechanisms to Pathophysiological Roles”, Sapporo, Japan, 2013.7.
- 2) Koyama, T., Tada, T., Fujita, H., Tokunaga, K.: Membrane-associated RING-CH (MARCH) 8 protein inhibits HIV-1 infection. Frontiers of Retrovirology Conference 2013, Cambridge, UK, 2013. 9.
- 3) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 感染を抑制する．第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 4) 張延昭、小山貴芳、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：SAMHD1 非依存的な HIV-1 複製阻害に關与する IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子の探索．第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 5) Juan F Arias、小山貴芳、岩部幸枝、横山勝、佐藤裕徳、徳永研三：APOBEC3G の二量体化は LINE-1 転移抑制に重要である．第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 6) 亀岡正典、Piraporn Utachee、Panasda Isarangkura-na-ayuthaya、徳永研三、生田和良、武田直和：HIV-1 CRF01\_AE 株が gp120 CD4 結合部位を認識する単クローン抗体に対して中和抵抗性を示す分子機構．第 61 回日本ウイルス学会総会（神戸）2013. 11.
- 7) 大久保麻佳、榎崎彩香、萩森政頼、山口泰史、藤井佑樹、藤原俊幸、徳永研三、藤田英明：亜鉛輸送体 ZIP14 の細胞内輸送および機能発現制御に関する基礎的解

析．第 30 回日本薬学会九州支部大会（長崎）2013. 12.

- 8) 小山貴芳、多田卓哉、藤田英明、徳永研三：膜貫通蛋白 MARCH8 による HIV-1 感染阻害．第 36 回日本分子生物学会（神戸）2013. 12.
- 9) Koyama, T, Arias, J.F., Iwabu, Y., Yokoyama, M., Fujita, H., Sato, H., Tokunaga, K. APOBEC3G oligomerization is associated with the inhibition of Alu and LINE-1 retrotransposition. Keystone Symposia “Mobile Genetic Elements and Genome Evolution”, Santa Fe, USA, 2014. 3.

#### 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