

HIV 潜伏・再活性化に関与する 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：本年度、まず我々は、HIV-1 感染抑制活性がインターフェロン（IFN）の II 型、III 型には殆どなく I 型特異的であることを確認した。そこで I 型 IFN の誘導により発現が著しく惹起される 6 種類の候補蛋白（APOBEC3A、IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15、及び RSAD2）と新規蛋白 MX2 の安定発現細胞、更に CRISPR/CAS9 システムによるそれら遺伝子のノックアウト細胞を用いて、HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスによる感染実験を行った。その結果、前者の実験で、特に IFITM ファミリー蛋白が MX2 レベルの感染抑制活性を示すことを見出した。一方、後者の実験では、個々の遺伝子のジーンサイレンシングでは I 型 IFN による強力な感染抑制からの回復は不十分であった。以上のことから、未知の遺伝子を含む複数の遺伝子が感染抑制に寄与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

我々はこれまでの研究において、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 感染前期抑制は Vpx 存在下でも解除されないこと、つまり、SAMHD1 非依存的な HIV-1 感染抑制効果を見出した。本研究においては、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。昨年度までに、IFN- α によって強力に誘導されることが明らかになった 6 種類の候補遺伝子、APOBEC3A、IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15、及び RSAD2 を 3 種類の異なる方法により発現させ、HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスを用いた感染実験を行うことにより、候補遺伝子産物による感染抑制効果を検討した。また CRISPR/CAS9 システムを用いた候補遺伝子のノックアウトにより、IFN 存在下において、HIV-1 感染効率の回復が認められるか否かを調べた。

B. 研究方法

まず、HIV-1 感染抑制効果が I 型 IFN 特異的か否かを検証した。次に昨年、候補遺伝子として

同定した IFITM1、IFITM2、IFITM3、ISG15 及び RSAD2 と新規蛋白 MX2 の安定発現細胞株を、DNA 導入後の薬剤選択またはレンチウイルスによるトランスダクションの二種類、計三種類の方法で樹立した。それらの細胞に HIV-1 ルシフェラーゼレポーターウイルスを感染させてルシフェラーゼアッセイにより感染性の定量を行った。詳細は以下の通り。

1. IFN I 型・II 型・III 型の処理による単球細胞株の調製

単球細胞株 THP-1 を phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Sigma) 30 ng/ml で一晩処理した後、I 型 IFN (α , β , 及び ω)、II 型 IFN (γ) または III 型 IFN (λ) をそれぞれ 500 U/ml を加えて培養した。

2. ネオマイシン耐性候補遺伝子発現プラスミドの構築

pCXN2（京大ウイルス研・朝長先生より分与）から切り出した TK プロモーター/ネオマイシン耐性遺伝子を pCAGGS に挿入した後、そのマルチクローニングサイトに C 末 HA タグを挿入して、PCR 増幅した各候補遺伝子を挿入して作製した。

3. T細胞株 M8166 へのトランスフェクションによる安定発現細胞株の樹立

2 で作製したネオマイシン耐性候補遺伝子発現プラスミドをそれぞれ、T細胞株 M8166 に 4D-Nucleofector システム (Lonza) を用いてトランスフェクションし、48 時間後に 1 mg/ml の G418 (Wako) を添加、1 週間培養して安定発現細胞を樹立した。

4. 候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの構築

前述の pCAGGS バックボーンに HA タグ付き候補遺伝子発現ベクターのインサート部分をタグごと PCR 増幅した後、レンチシャトルベクターに挿入して作製した。

5. レンチウイルスベクターによる候補遺伝子の 293T 細胞へのトランスダクション

4 で作製した候補遺伝子発現レンチウイルスベクター、パッケージングベクター、Rev、Tat、及び水疱性口炎ウイルス G 蛋白 (VSV-G) 発現ベクターを 293T 細胞にコトランスフェクションして、48 時間後に上清中のウイルス量を p24 antigen capture ELISA (ABL) により測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 5 で 293T 細胞にトランスダクションした。

6. ネオマイシン耐性遺伝子付き候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの構築

上記の候補遺伝子発現レンチウイルスベクターの GFP 遺伝子部分をそれぞれネオマイシン耐性遺伝子と取り換えることにより作製した。

7. ネオマイシン耐性遺伝子付加レンチウイルスベクターによる安定発現 HeLa 細胞の樹立

6 で作製したネオマイシン耐性遺伝子付き候補遺伝子発現レンチウイルスベクターを用いて、5 と同様にコトランスフェクションして、p24 量を測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 5 で HeLa 細胞にトランスダクションした。48 時間後に 500 µg /ml の G418 を添加、4 日間培養して安定発現細胞を樹立した。

8. 候補遺伝子ノックアウト用 CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターの構築

3'側に PAM 配列を有する 20 塩基の標的配列を候補遺伝子ごとにデザインして、各オリゴリンカーを CRISPR/Cas9 発現レンチウイルスベクターに挿入することにより作製、候補遺伝子発現ベクターとのコトランスフェクションによ

り、ノックアウト効率を確認した。コントロールとして SAMHD1 ノックアウトベクターも作製した。

9. CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクターによる候補遺伝子ノックアウト THP-1 細胞の樹立
8 で作製した CRISPR/Cas9 レンチウイルスベクターを用いて、5 と同様にコトランスフェクションして、p24 量を測定した。得られたレンチウイルスベクターを MOI 3 で THP-1 細胞にトランスダクションした。48 時間後に 0.5 µg /ml の puromycin を添加、4 日間培養して安定発現細胞を樹立した。

10. SIV Vpx 取込み用の SIV gag p6 付加 HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA の構築

HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA の gag p6 領域に、SIV の Vpx 結合モチーフである DPAVDLL 配列を挿入して作製した。また RRE 配列を付加した SIVmac 由来 Vpx 発現ベクターを各 PCR 断片の pCAGGS への挿入により構築した。

11. 感染実験 上記の 1 で調整した IFN 処理細胞は IFN 添加後の翌日、3、7 及び 9 で調整した安定発現細胞は樹立後すぐに、また 5 で調整した細胞はトランスダクションの 48 時間後に感染実験に用いた。1 の IFN 処理細胞または 3、5、及び 7 の候補遺伝子発現細胞を用いる感染実験では、まず 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 及び 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た。48 時間後に上清中の p24 量を測定して、各細胞に感染を行い、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。9 の候補遺伝子ノックアウト細胞を用いる感染実験では、ウイルスの調製のために、10 で作製した SIV gag p6 付加 HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA と SIVmac Vpx 発現ベクター及び VSV-G 発現ベクターを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、予め PMA 処理により分化させ、IFN-α 存在下または非存在下で培養したノックアウト THP-1 細胞に感染、ルシフェラーゼ活性を測定した。また各細胞における候補遺伝子の発現は全てウエスタンブロッ

ト法により確認した。

[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 及び平成 27 年 1 月 15 日付け承認番号・機 26-85 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 の HIV-1 感染前期抑制能は I 型特異的である

分化させた THP-1 細胞における IFN の HIV-1 感染前期抑制は III 型 (λ) では認められず、II 型 (γ) では部分的に観察された。I 型 (α 、 β 、及び ω) においては非常に強い抗ウイルス活性が認められ、特に IFN- β で最も顕著であった。この結果より、我々はウイルス複製サイクル前期の HIV-1 に対する IFN の抗ウイルス活性は I 型特異的であると結論づけた。

2. IFITM ファミリー蛋白は強い抗ウイルス活性を有する

プラスミドベースの安定発現細胞の実験では、いずれの細胞においても感染抑制効果は比較的小さかったものの IFITM ファミリー蛋白発現細胞では感染を 30~40%抑制する効果が認められた。実験系をレンチウイルスベクターの系に変更して行った結果、ISG15 または RSAD2 で 50%程度の抑制効果が、また IFITM ファミリー蛋白では平均で 75%程度の抑制効果が認められた。後者は MX2 発現細胞とほぼ同程度であった。レンチウイルスベクターの系で認められた結果を再現的に観察するために、全てのレンチウイルスベクターにネオマイシン耐性遺伝子を挿入して、作製したウイルスを用いたトランスダクションを行った後、G418 による薬剤選択をして安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞において、IFITM ファミリー蛋白発現細胞における HIV-1 感染阻害はより顕著となり、MX2 発現細胞とともに 90%以上の抑制効果を示した。

3. I 型 IFN による HIV-1 感染前期抑制は MX2 や IFITM ファミリーのみではない

今回、CRISPR/Cas9 システムを導入して効率よ

いジーンサイレンシングを試みた。各候補遺伝子に対してそれぞれ作製した CRISPR/Cas9 レンチウイルス発現ベクターの高いノックアウト効率を確認した後に、安定ノックアウト THP-1 細胞を作製した。なお、分化した THP-1 細胞において SAMHD1 が高発現しており、実際 SAMHD1 による感染阻害は無視できないことから、HIV-1 ルシフェラーゼレポータープロウイルス DNA に SIV gag p6 配列を付加して Vpx を効率よく取り込めるプロウイルス DNA を作製した。新たに構築した SIVmac Vpx 発現ベクターとのコトランスフェクションによって得られたウイルスを用いて、分化させたノックアウト THP-1 細胞 (IFN- α 処理または未処理) に対する感染実験を行った。その結果、IFN- α 処理後の細胞においては、MX2 ノックアウトの場合に感染回復率は 15%程度認められ、APOBEC3A や IFITM ファミリー蛋白ノックアウトではそれぞれ 5%弱の回復が観察された。以上より、一部の ISG のみならず、MX2 をはじめ未知の遺伝子も含めた複数の因子が協調して、ウイルス複製サイクルの様々なステップを抑制的に制御している可能性が示唆された。

D. 考察

今年度の研究において、まず HIV-1 に対する IFN の抗ウイルス活性が I 型に非常に特異的であることが明らかになった。候補遺伝子発現プラスミドのトランスフェクションによる安定発現細胞の実験においては、APOBEC3A 発現細胞が恐らくその毒性により、極めて低い細胞増殖率を示したため、これ以降からの蛋白発現実験からは除外することとした。それ以外の安定発現細胞においても、プラスミドベースの実験では増殖率にばらつきがあり、感染時に細胞数を揃えてもアッセイの時点で細胞数が異なったことから、レンチウイルスベクターの系へと変更した。しかしながら、当初はウイルスベクター DNA に薬剤耐性遺伝子が含まれていなかったため、トランスダクション後に薬剤選択が出来ず、MOI を上げることで、理論上 100%の細胞に目的遺伝子が導入されているものとして実験を行った。その実験系では、実験をリピートする毎に感染実験の測定値が大きくなるため、最終的にレンチウイルスベクター

DNA にネオマイシン耐性遺伝子を入れることによって、薬剤選択による安定発現細胞の樹立が可能となった。その結果、MX2 と三種類の IFITM ファミリー蛋白が HIV-1 に対して最も強い抑制活性を示すことが明らかとなった。その一方で、各遺伝子のジーンサイレンシングにおいては、IFN- 処理による感染抑制からの回復はどれも不十分で、決して一つや二つの主要細胞因子が抑制に寄与しているわけではないことが判明した。

E. 結論

(1) IFN の HIV-1 感染前期抑制は I 型 (α , β , 及び ω) に特異的な機能であった。

(2) 候補遺伝子の単独安定発現系において、三種類の IFITM ファミリー蛋白が MX2 と比べても遜色ない抑制活性を示すことが分かった。

(3) 候補遺伝子のノックアウト細胞の樹立により、それぞれの遺伝子のサイレンシングによる感染回復効果は弱く、未知の遺伝子を含む複数の遺伝子が感染抑制に寄与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Utachee, P., Isarangkura-na-ayuthaya, P., Tokunaga, K., Ikuta, K., Takeda, N., Kameoka, M.: Impact of amino acid substitutions in the V2 and C2 regions of human immunodeficiency virus type 1 CRF01_AE envelope glycoprotein gp120 on viral neutralization susceptibility to broadly neutralizing antibodies specific for the CD4 binding site. *Retrovirology* 11:32, 2014.
- 2) Zhou, D., Wang, Y., Tokunaga, K., Huang, F., Sun B, Yang, R.: The HIV-1 accessory protein Vpr induces the degradation of the anti-HIV-1 agent APOBEC3G through a VprBP-mediated proteasomal pathway. *Virus Res.* 195:25-34, 2015.
- 3) Kikuchi, T., Iwabu, Y., Tada, T., Kawana-Tachikawa, A., Koga, M., Hosoya,

N., Nomura, S., Brumme, Z.L., Jessen, H., Pereyra, F., Piechocka-Trocha, A., Walker, B.D., Iwamoto, A., Tokunaga, K (co-corresponding author), Miura, T.: Anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif protein is attenuated in elite controllers. *J. Virol.* In press.

- 4) 多田卓哉、徳永研三：抗ウイルス宿主因子 BST-2/tetherin とそれに拮抗するウイルス蛋白の分子間対決 Molecular Confrontation between the Host Restriction Factor BST-2/Tetherin and Its Viral Antagonists . 日本エイズ学会誌 16: 126-136, 2014.

学会発表

- 1) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規抗ウイルス宿主因子 MARCH8 による HIV-1 感染抑制機構の解明 .第 62 回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
- 2) 張延昭、多田卓哉、山岡昇司、徳永研三：HIV-1 複製前期の抑制に関わる IFN 誘導性抗ウイルス宿主因子群の解析 . 第 62 回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2014. 11.
- 3) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫： HIV-1 インテグラーゼの非酵素的機能の解析 . 第 62 回日本ウイルス学会総会 (横浜) 2014. 11.
- 4) 和田倭、小林(石原)美栄、寺原和孝、池野翔太、徳永研三、川名(立川)愛、山岸誠、竹山春子、横田(恒次)恭子：恒常的に培養維持された CD4 陽性 T 細胞への HIV-1 の感染とその転写制御機構の解明 . 第 62 回日本ウイルス学会総会(横浜) 2014. 11.
- 5) 高畑辰郎、徳永研三、長谷川温彦、神奈木真理、増田貴夫： HIV-1 インテグラーゼの逆転写過程以前における機能の解析 .第 28 回日本エイズ学会 (大阪) 2014. 12.
- 6) 多田卓哉、張延昭、小山貴芳、山岡昇司、藤田英明、徳永研三：新規宿主因子 MARCH8 は HIV-1 のエントリーを阻害する . 第 28 回日本エイズ学会 (大阪) 2014. 12.
- 7) Tada, T., Zhang, Y., Koyama, T., Yamaoka, S.,

Fujita, H., and Tokunaga, K (speaker).: Novel restriction factor MARCH8 blocks HIV-1 replication. XX International AIDS Conference, Melbourne, Australia, 2014. 7. (Late breaker's oral abstract)

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