

研究課題：HIV 粒子脱殻における Gag の機能に関する研究

研究分担者：塩田 達雄（大阪大学微生物病研究所 教授）

研究要旨

旧世界サル（旧世界サル）の TRIM5 α の HIV 感染阻害の分子機構の詳細は未だ明らかにされていない。今のところ、細胞全体の融解液中のコアの崩壊状況を蔗糖密度勾配遠心により検討する生化学的実験結果から、TRIM5 α は細胞質内に侵入してきたウイルスのカプシドを認識してコアを破壊することにより感染を阻害すると考えられている。本研究では、蛍光色素で HIV 粒子とコアとを標識して培養細胞に感染させ、経時的に蛍光色素の解離を蛍光顕微鏡で観察することにより HIV の脱殻過程を観察する *in situ* uncoating assay を用いて、カニクイザル、アカゲザル等の旧世界サルの TRIM5 α 存在下での HIV-1 ならびに HIV-2 の脱殻状況を観察した。その結果、旧世界サルの TRIM5 α 存在下では、HIV-1 の脱殻が促進されること、カニクイザル TRIM5 α に感受性を示す HIV-2 株の場合にはカニクイザル TRIM5 α 存在下で脱殻が促進されるが、カニクイザル TRIM5 α に耐性を示す HIV-2 変異株の場合には脱殻は促進されないこと、が明らかになった。これらの結果から、従来、生化学的手法で示唆されたコアの速やかな破壊が、TRIM5 α の感染阻害の本態であることが明確になった。

A. 研究目的

TRIM5 α はアカゲザルの抗ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) 因子として報告された。レトロウイルスに対する自然免疫を担う重要な因子であるが、その HIV 感染阻害の分子機構の詳細は明らかにされていない。アカゲザル、カニクイザルの TRIM5 α は強い抗 HIV-1 作用を示す一方、ヒトの TRIM5 α はごく弱い抗 HIV-1 作用を持ち、その結果ヒトでの HIV-1 感染は拡大を続けていると考えられる。HIV-1 がヒトとチンパンジー以外の動物に感染できないために動物実験が成り立たず、その結果、HIV-1 感染症の病態解明やワクチン開発の障害となっている。

今のところ、感染細胞全体の融解液中のコアの崩壊状況を蔗糖密度勾配遠心により検討する生化学的実験結果から、TRIM5 α は細胞質内に侵入してきたウイルスのカプシドを認識してコアを破壊することにより感染を阻害すると考えられている。しかしこの方法では、細胞に非特異的に取り込まれ、その後の感染成立には至らない HIV コアの崩壊状況も併せて観察することになり、感染成立に至る経路に入った HIV 粒子のカプシドの崩壊状況を正しく観察していると言うことは出来なかった。そこで我々は、異なる蛍光色素で HIV 粒子のエンベロップ、コア内の Vpr、コアの構成成分である P24 を染め分けることにより、感染成立に至る経路に正しく入った HIV 粒子のカプシドのみの崩壊状況を蛍光顕微鏡により解析する *in situ* uncoating assay を用いて、旧世界サルの TRIM5 α が HIV カプシドの崩壊を引き起こしているか否かを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. カニクイザル TRIM5 α 発現ヒト細胞の作成

ハイグロマイシン耐性遺伝子を持つ発現ベクター-pCEP4 に HA タグを付したカニクイザル TRIM5 α 遺伝子を挿入してヒト HeLa 細胞に導入し、hygromycin B 存在下で培養してカニクイザル TRIM5 α 発現細胞を選別した。カニクイザル TRIM5 α の発現は HA タグに対する抗体で導入細胞を染色して確認した。カニクイザル TRIM5 α の抗 HIV 活性は、緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する HIV-1 あるいは HIV-2 を感染させ、GFP 発現細胞数がベクターのみを導入した細胞と比べて低下することにより確認した。

2. *In situ* uncoating assay

Campbell らの方法によった (Campbell et al. (2007) *Virology* 360: 286-293)。まず、Env 遺伝子にフレームシフト変異を導入した HIV-1 あるいは HIV-2 プロウイルス DNA と蛍光色素 dTomato で標識した Src 遺伝子の N 末端 15 アミノ酸、GFP で標識した Vpr あるいは Vpx、水疱性口内炎ウイルスの G タンパク質をそれぞれ発現するプラスミドを 293 細胞に導入して組み換えウイルスを回収した。得られた組み換えウイルスを HeLa 細胞に感染させ、経時的に固定してカプシドタンパク質 p24 (CA) を Cy5 標識抗体で染色し、GFP、dTomato、Cy5 それぞれの色素を励起して蛍光顕微鏡にて検出した。得られた画像を deconvolution 処理をして不明瞭な蛍光シグナルを除去し、細胞内のそれぞれの蛍光シグナルの数を測定した。正しくエンベロップが外れて細胞質内に侵入したと考えられる dTOMATO の蛍光を含まない GFP シグナルのうち、脱殻前と考えられる Cy5 シグナルを有するシグナルを数えて、脱殻速度を計算した。

C. 研究結果

1. カニクイザルTRIM5 α 発現ヒト細胞の作成

TRIM5 α 発現ベクター導入後、3つの独立したHeLa細胞株を樹立した。図1にこれらの細胞株でのカニクイザルTRIM5 α の発現を示す。ウエスタンブロット(図1A)、蛍光染色(図1B)とも3つの細胞株で同様にカニクイザルTRIM5 α が発現していることが確認できた。また、GFPを発現するHIV-1あるいはHIV-2をこれらの細胞株に感染させると、GFP発現細胞の数がベクターのみを導入した細胞株と比べて低下することから、発現したカニクイザルTRIM5 α が抗HIV活性を保持していることが確認された(図1C)。

2. In situ uncoating assay

1. で作製したカニクイザル TRIM5 α を発現するHeLa細胞に、dTomatoでエンベロープを標識しコア内にGFPで標識したVprあるいはVpxを持ち、水疱性口内炎ウイルスのGタンパク質でシュードタイプしたHIV-1あるいはHIV-2を感染させ、経時的に細胞を固定してコアの構成成分であるP24(CA)をCy5で染色して蛍光顕微鏡で観察した。dTomatoの蛍光を失って感染成立の経路に正しく入ったHIV粒子について、脱殻前と考えられるGFPとCy5の蛍光が共局在するものと脱殻が完了したと考えられるCy5の蛍光と共局在しないGFPの数を数えて脱殻した粒子の割合を計算した。その結果、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されるHIV-1(NL-Nh:NL43株のenv欠損株)とHIV-2(GH123-Nh:GH123株のenv欠損株)は、カニクイザルTRIM5 α 発現細胞株においてはCAと共局在しないGFP粒子の割合がベクターのみを導入した細胞株においてより有意に減少し、脱殻がカニクイザルTRIM5 α の存在により亢進していることが明らかになった(図2の左側と中のグラフ)。一方、カニクイザルTRIM5 α によってその感染がほとんど抑制されないHIV-1の変異株(ASA-Nh:GH123ASA株のenv欠損株)については、カニクイザルTRIM5 α の存在によりCAと共局在しないGFP粒子の割合は変化せず、脱殻の速度に影響がないことが明らかになった(図2の右側のグラフ)。

D. 考察

本研究によりエンベロープを失って感染成立に至る経路に正しく入ったHIV粒子のカプシドのみの崩壊状況を検討しても、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されるHIV-1とHIV-2は、カニクイザルTRIM5 α の存在によりその脱殻が促進されること、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されないHIV-2変異株においては脱殻の促進は観察されないことが明らかになった。ASA-Nhは

GH123-NhとカニクイザルTRIM5 α の認識に関わるCAの3アミノ酸のみが異なっており、ウイルスのTRIM5 α 感受性の違いが確かに脱殻速度に反映されていることが確認された。本研究により脱殻の制御が新規の抗HIV戦略策定に繋がることが示唆された。

E. 結論

感染成立に至る経路に正しく入ったHIV粒子のカプシドのみの崩壊状況を検討しても、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されるHIV-1とHIV-2はカニクイザルTRIM5 α の存在によりその脱殻が促進されること、カニクイザルTRIM5 α により感染が抑制されないHIV-2変異株においては脱殻の促進は観察されないことが明らかになった。従って、従来、生化学的手法で示唆されたコアの速やかな破壊が、TRIM5 α の感染阻害の本態であることが明確になった。

F. 知的所有権の取得状況

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takeda E, Kono K, Hulme AE, Hope TJ, Nakayama EE, Shioda T. Fluorescent image analysis of HIV-1 and HIV-2 uncoating kinetics in the presence of old world monkey TRIM5 α . *PLoS one* 2015 Accepted

2) Hayasaka H, Kobayashi D, Yoshimura H, Nakayama EE, Shioda T, Miyasaka M. The HIV-1 gp120/CXCR4 axis promotes CCR7 ligand-dependent CD4 T cell migration: CCR7 homo- and CCR7/CXCR4 hetero-oligomer formation as a possible mechanism for up-regulation of functional CCR7. *PLoS one* 2015 Accepted

3) Nomaguchi M, Nakayama EE, Yokoyama M, Doi N, Igarashi T, Shioda T, Sato H, Adachi A. Distinct combinations of amino acid substitutions in N-terminal domain of Gag-capsid afford HIV-1 resistance to rhesus TRIM5 α . *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 16:936-944, 2014.

2. 学会発表等

1) Tatsuo Shioda: Host Factors in the Pathogenesis of HIV Infection. 17th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) AIDS Panel Meeting 2015年1月26日-29日 Taipei, Taiwan

2) 櫻木小百合, 塩田達雄, 櫻木淳一: HIV パッケージシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第28回日本エイズ学会学

術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

3) 中山英美, Uttayamakul Sumonmal, Tiphaine Oudot-Mellakh, Pimrapat Tengtrakulcharoen, Julien Guergnon, Jean-Francois Delfraissy, Srisin Khusmith, Chariya Sangsajja, Sirirat Likanonsakul, Ioannis Theodorou, 塩田達雄: Genome-wide association study of HIV-related lipoatrophy in Thai patients: Association of a DLGAP1 polymorphism with fat loss. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

4) 武田英里,河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 存在下における HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻 第28回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

5) 田谷かほる, 武田英里, 中山英美, 塩田達雄, 明里宏文, 金子新. 再生医療技術のエイズ研究応用のためのアカゲザル iPS 細胞樹立と CD34 陽性細胞への分化. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

6) Tahmina Sultana, 中山英美, 飛田哲志, 齊藤暁, 明里宏文, 塩田達雄: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. 第28回日本エイズ学会学術集会・総会 2014年12月3日-5日 大阪,日本

7) 櫻木淳一, 櫻木小百合, 塩田達雄: HIV-1 パッケージングシグナル内最重要領域 SL1 の機能的構造に関する多角的解析. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月10日-12日 横浜,日本

8) 武田英里,河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: TRIM5 による HIV-1 および HIV-2 のカプシドコアの脱殻促進:可視化ウイルスによる解析. 第62回日本ウ

イルス学会学術集会 2014年11月10日-12日 横浜,日本

9) Tatsuo Shioda: Host factors in the pathogenesis of HIV infection. International Congress on Medical Virology 2014 2014年11月5日-7日 Bangkok, Thailand

10) Emi E Nakayama, Tetsushi Tobita, Tahmina Sultana, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Tatsuo Shioda: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. The 13th Awaji International Forum on Infection and Immunity in Nara 2014年9月23日-26日 奈良,日本

11) 武田英里, 河野健, Amy E. Hulme, Thomas J. Hope, 中山英美, 塩田達雄: In situ uncoating assay を用いた TRIM5 存在下における HIV カプシドコアの脱殻速度の解析. 第28回近畿エイズ研究会・学術集会 2014年6月7日 大阪,日本

12) Sayuri Sakuragi, Tatsuo Shioda, Jun-ichi Sakuragi: SL1 revisited Functional analysis of the structure and conformation of HIV-1 psi RNA. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program (RETROVIRUSES) 2014年5月19日-24日 Cold Spring Harbor, USA.

13) Emi E. Nakayama, Satoshi Tobita, Tahmina Sultana, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Tatsuo Shioda: Novel mutant HIV-1 strains with high degree of resistance to cynomolgus macaque TRIMCyp generated by random mutagenesis. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings & Courses Program (RETROVIRUSES) 2014年5月19日-24日 Cold Spring Harbor, USA.

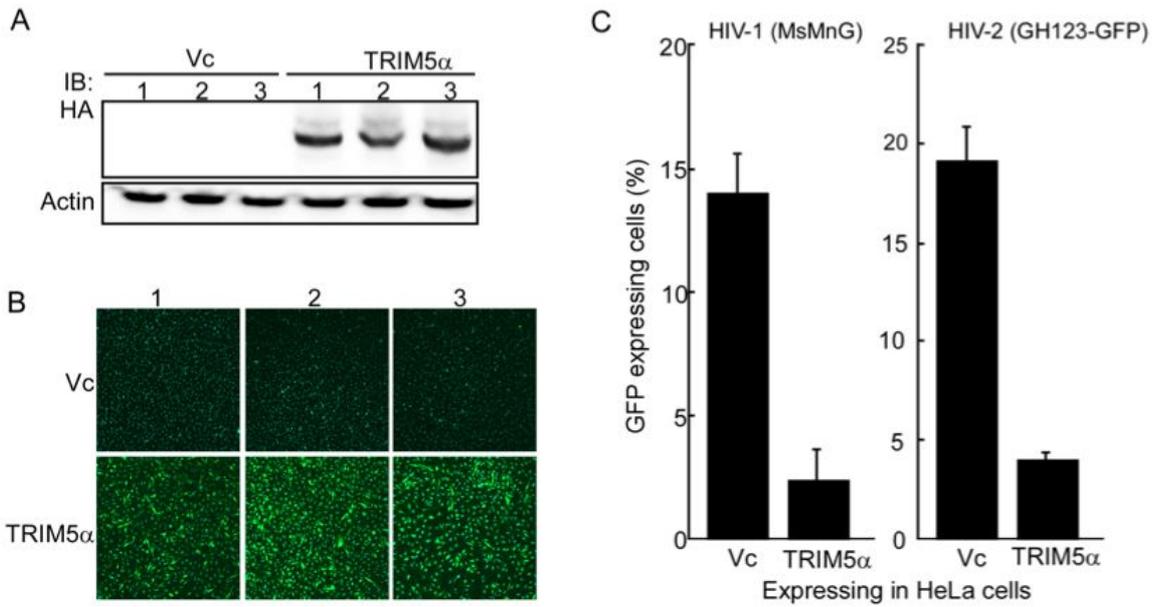


図1：ヒト HeLA 細胞におけるカニクイザル TRIM5 α の発現。 ウェスタンブロット (A) と蛍光抗体法 (B) によりカニクイザル TRIM5 α の発現を確認した (Bは DAPI との共染色)。 緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する HIV-1 あるいは HIV-2 を感染させ、発現させたカニクイザル TRIM5 α が抗 HIV 活性を保持していることを確認した。

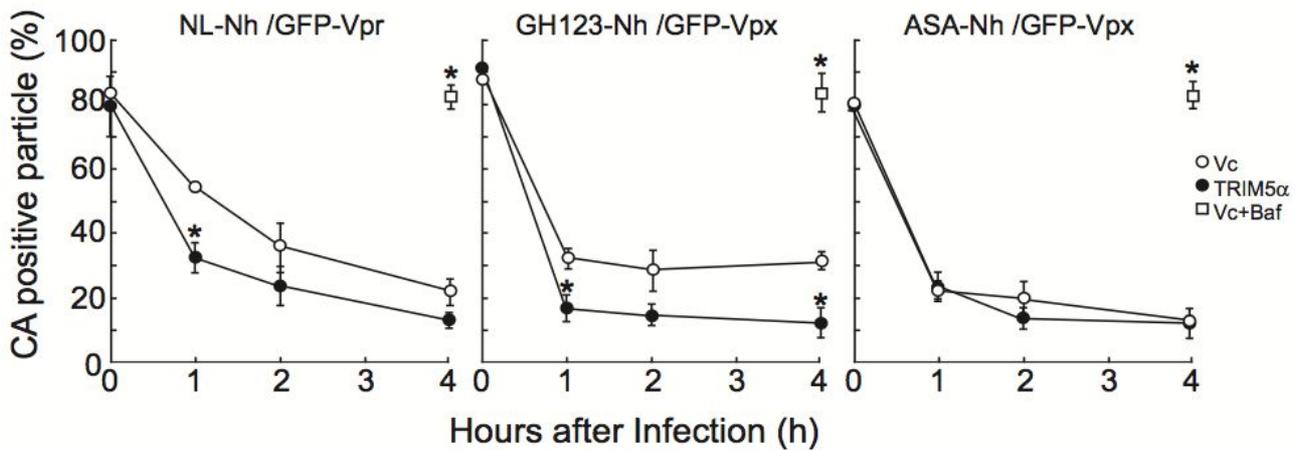


図2：In situ uncoating assay。 カニクイザル TRIM5 α により感染が抑制される NL-Nh や GH123-Nh はカニクイザル TRIM5 α 存在下 (黒丸) ではベクターのみの細胞 (白丸) と比べて有意 (*) に脱殻速度の亢進が認められた。一方、カニクイザル TRIM5 α により感染が抑制されない ASA-Nh では脱殻速度の亢進は認められなかった。なお、パフィロマイシン存在下では膜融合が生じないためにコアが細胞内へ侵入しないため脱殻は全く進行しない (Baf : 白四角)。