

## 研究課題：HIV Gag 蛋白質と関連因子の治療標的構造の解明に向けた統合的研究

研究分担者：蝦名 博貴（京都大学ウイルス研究所 助教）

研究協力者：小柳 義夫（京都大学ウイルス研究所 教授）、野間口 雅子（徳島大学 准教授）

### 研究要旨

Gag 蛋白質は HIV 複製全般に重要な蛋白質である。複製後期過程における Gag 蛋白質の機能はウイルス粒子形成、ウイルス RNA の粒子への取り込みなど多岐にわたることが知られているが、細胞内でそれらが機能する時と場所は明らかになっていない。そこで本研究では HIV 複製後期過程において Gag 蛋白質が機能する時空的知見を収集することを目的として、Gag 蛋白質の細胞内ライブイメージング解析実験系の構築を行なった。そして、その実験系を用いて Gag の CA 変異体 I134Q, S149N 変異体の解析を行なった。その結果、I134Q 変異体ではウイルス粒子形成過程で Gag 蛋白質が細胞質膜で凝集すること、S149N 株では多くの Gag 蛋白質は細胞質内器官に留まっていることを明らかにした。また、ゲノム編集技術を用いることで、ウイルス複製に重要な領域、すなわち、ウイルスの脆弱部位を DNA レベルで検索するシステムを構築し、その評価を行なった。

### A. 研究目的

本研究の目的は、HIV-1 複製に必須な Gag の機能、並びに、その機能発現の責任領域を明らかにして創薬探索の基盤を築くことである。目的遂行のため、1)ウイルス複製後期過程の Gag の輸送、そして、その mRNA との会合の時と場所を解析するためのライブイメージング解析実験系の確立、2)ゲノム編集法を使ったウイルス脆弱部位の検索実験系の構築を目的とした。

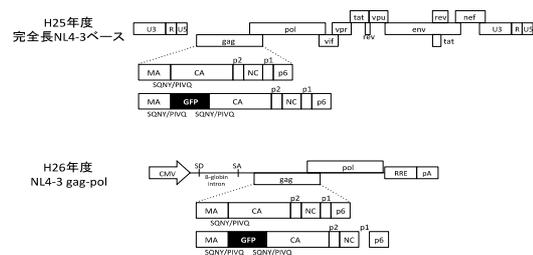
### B. 研究方法

H25 年度に作製した完全長 HIV-1<sub>NL4-3</sub> の MA-CA 切断部位に蛍光蛋白質遺伝子を挿入したウイルスは、その複製が不完全であり、さらに Vpr など細胞毒性を示すウイルス蛋白質も発現することから、ライブイメージングの解析効率に問題があった。そこで、H26 年度は新規に HIV-1<sub>NL4-3</sub> をベースとするレンチウイルスベクターシステムを構築した上で、その MA-CA 切断部位に蛍光蛋白質遺伝子を挿入して、Gag のライブイメージングシステムを新たに構築した（図 1）。このレンチウイルスベクターをベースとしたシステムでは、ウイルスの複製過程を観察できないものの、複製後期過程の Gag 輸送、Gag とウイルス RNA との会合の時と場所を解析することに特化したものとなっている。蛍光標識 Gag 蛋白質の局在解析には共焦点顕微鏡、ならびに、GE Cytell システムを用いた。

その他、ゲノム編集法を使ったウイルス脆弱部位の検索実験系の検証実験を行なった。ゲノム編集法は生細胞内で任意の DNA 標的配列を切断し、NHEJ 修復経路を介してランダムな Insertion/deletion (indel)変異を導入する事が出来る革新的技術である。我々は、ゲノム編集法の CRISPR/Cas9 システムが HIV プロウイルスに対しても有効であることを見出していることから、

このシステムを用いて DNA レベルで標的部位に mutation をランダムに導入し、その中から増殖してくる(選択された)ウイルスゲノムのシーケンスを解析することによって、ウイルスが変異できない部位、すなわち、ウイルスの脆弱部位を検索する方法の検証をおこなった。まず、CRISPR システムのレンチウイルスベクター導入系を独自に構築し、そのレンチウイルスベクター導入系を用いて HIV 標的 gRNA と Cas9 蛋白質を恒常的に発現する Jurkat 細胞を樹立した。そして、その樹立した CRISPR 発現 Jurkat に HIV-1<sub>NL4-3</sub> を感染させ HIV の複製、並びに、その細胞で増殖した (CRISPR 耐性) ウイルス RNA のシーケンスの解析を行なった。

図 1：蛍光標識 Gag 蛋白質発現コンストラクト



### (倫理面への配慮)

本申請研究では HIV 遺伝子を含む遺伝子組み換え実験を行うため原則として P3 レベルの封じ込めが必要な機関承認実験と一部大臣確認実験である。当研究所には P3 レベルの物理的封じ込めが完備しており、既に、組換え HIV 使用に関

する機関承認実験、ならびに大臣確認実験の手続きも完了している。

実験動物である NOG マウスの使用はカルタヘナ条約を守り、動物愛護法、および 3R(Replacement(代替)、Reduction(削除)、Refinement(改善))の理念に基づき実験を行なう。また、当大学動物委員会の承認は既に得ている。

### C. 研究結果

再構築した蛍光標識 Gag 解析システムを用いて、徳島大学・野間口雅子 准教授との共同研究として、1)Gag processing 不全 CA I134Q 変異体、2)後期過程が親株よりも悪くなる CA S149N 変異体の Gag 蛋白質の細胞内局在解析を行なった。その結果、I134Q 変異体ではウイルス粒子形成過程で Gag 蛋白質が細胞質膜で凝集すること、S149N 株では多くの Gag 蛋白質は細胞質内器官に留まっていることを明らかにした (図 2)。

また、GE Cytell システムを用いて、これら GFP 標識 Gag 変異蛋白質の細胞質における分布を、細胞質領域における GFP 蛍光輝度の最大値と最低値のばらつき (SD) として算出した。その結果、野生型 Gag に比して、I134Q、S149N 変異体では、優位に SD 値が高く、Gag 蛋白質の局在に偏りがある事が見出された。また、それぞれの細胞における単位蛍光強度あたりの蛋白質局在のばらつき (SD) を CV として算出した場合 (細胞質の蛍光輝度のばらつき SD/細胞質の蛍光輝度の総和) も同様に、Gag 変異体は野生型に比べて有意に高く、その局在にばらつきがあることが示された (図 3 右)。

ゲノム編集法を使った DNA レベルでのウイルスの脆弱部位の検索実験系の検証には、LTR の non functional region (T295)、NF- $\kappa$ B 結合領域 (T6)、TAR (T5) を標的とする gRNA を用いた (図 4)。それぞれの gRNA と Cas9 を恒常的に発現する Jurkat 細胞を作製し、HIV-1<sub>NL4-3</sub> を感染させ、上清中の p24 を測定することで CRISPR 導入細胞におけるウイルス増殖を検証した (図 5)。その結果、HIV 標的 CRISPR 導入細胞においてウイルス増殖の遅延が確認された (図 6)。また、それぞれの CRISPR 導入細胞から増殖したウイルスゲノムの配列をシーケンス解析した結果、CRISPR 標的部位に変異が誘導されていた。興味深い事に、non functional region (T295) を標的とする CRISPR 導入細胞で増殖したウイルスには、ゲノム編集法で導入される典型的なランダム indel 変異が誘導されていたが、ウイルス増殖に必須な NF- $\kappa$ B binding region (T6) と TAR (T5) を標的とする CRISPR 導入細胞で増殖したウイルスには、ランダムな indel 変異ではなく、その変異導入に傾向

図 2: Gag 変異体の局在の共焦点顕微鏡解析

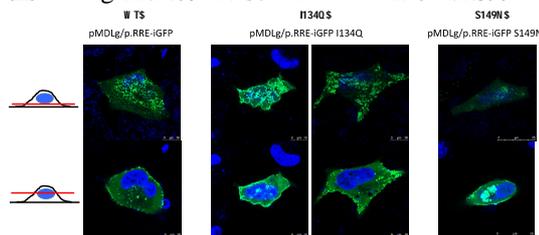


図 3: 細胞質における蛍光標識 Gag 蛋白質のばらつき

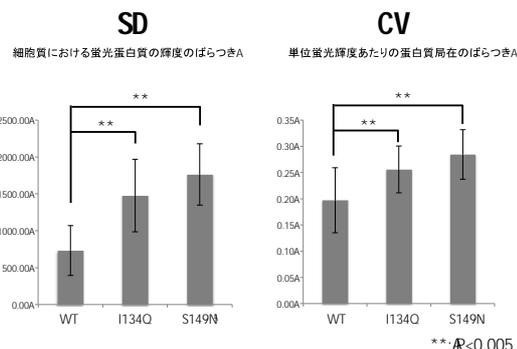


図 4: gRNA の設計

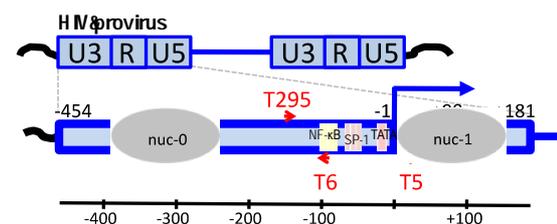
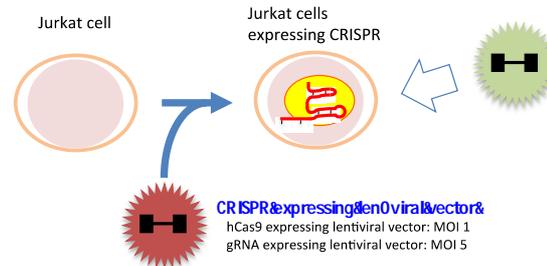


図 5: 感染実験概要



がみられた (図 7)。具体的には、T6 標的 CRISPR 耐性ウイルスでは二つの NF- $\kappa$ B binding region のうち一つは保持されたままであり、T5 領域には TAR ステムループの構造を保持するように点変異が導入されていたものが多く検出された。また、T6 と T5 導入細胞では T295 導入細胞より強力な

図 6: CRISPR 導入 Jurkat 細胞における HIV-1<sub>NL4-3</sub> 増殖

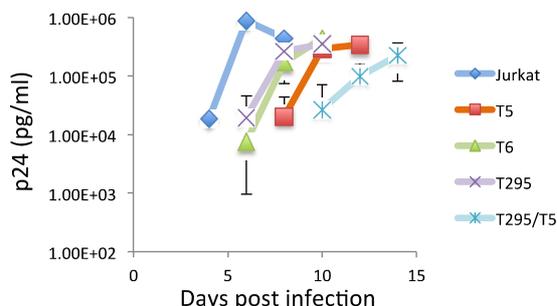


図 7: CRISPR 導入 Jurkat 細胞で増殖したウイルス RNA 配列

**T5:** TAR sequence is essential for transcription of vRNA

```
WT  !GTCCTCTGTTAGACAGATCTGGAGCCTGGGAGCTCTCTG!
!
!GTCCTCTGTTAGACAGATCTGGAGCCTGGGAGCTCTCTG!
!GTCCTCTGTTAGATCAGATCTGGAGCCTGGGAGCTCTCTG!
!GTCCTCTGTTAGACAGATCTGGAGCCTGGGAGCTCTCTG!
!GTCCTCTGTT-----CCTGGAGCTCTCTG!
```

**T6:** NF-kB binding sequence is important for viral transcription

```
WT  !CTTGCTACAAGGGACTTTCC-----AGGGAGGC!
      NF-kB          NF-kB
!CTTGCTACAAGGGACTTTCC-----AGGGAGGC
!CTTGCTACAAGGGACTTTCCGCTGG-----AGGC
```

**T295:** non functional region

```
WT  !TCACGTGGCCGAG-----AGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG!
!
!TCACGTGGCCCG-----AGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG!
!TCACGTGGCCCGAGTAGTAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAG!
!TCAC-----GCTGCATCCGGAGTACTTCAAG!
```

ウイルス増殖の遅延効果が確認されたことから、ゲノム編集法を利用する事で、ウイルスの増殖に必須な部位 (=脆弱部位) を DNA レベルで検索可能であることが示唆された。

## D. 考察

本研究で確立した Gag のライプイメーシング実験系により、Gag の点変異体の細胞内局在の異常を明らかに出来たことから、今後も HIV の致死変異や複製制御因子を見つけた班員との連携により、Gag 発現と局在の制御要因の解析が期待できる。また、この Gag 蛋白質のライプイメーシング解析システムと H25 年度に構築した MS2 を利用したウイルス RNA のライプイメーシング法を組み合わせることで、Gag 蛋白質とウイルスゲノム RNA の相互作用の空間的解析が期待できる。

また、GE Cytell システムを導入する事によって、細胞質の蛋白質の定量解析が可能となった。今回の結果では、野生型 Gag は細胞膜に集積して、ウ

イルス様粒子 (VLP) を形成するものの、過度に aggregation を起こすことがなく、Gag 蛋白質の細胞質における偏りはある程度均一なものとなるが、変異体 I134Q では図 2 に示すように細胞膜で過度に aggregation し、蛍光輝度が極端に高い部分が生じた結果 SD は野生型に比べて有意に高く算出されたと考えられる。S149N では、Gag が細胞内小器官に蓄積されるため、蓄積された部位の蛍光輝度が強くなり、野生型より有意に SD 値が高くなったと考えられる(図 3 左)。

また、ゲノム編集法を使ったウイルス脆弱部位の検索実験系の構築過程において、細胞にあらかじめ HIV 標的 CRISPR システムを恒常発現させることで、HIV の複製を抑制できることが確認された。このことは、HIV 標的 CRISPR は潜伏状態プロウイルスの除去効果に加え、複製可能な HIV に対しても抗ウイルス効果があること、すなわち、HIV 標的 CRISPR を駆使した HIV 治療戦略が有用であることを示唆する。しかしながら、予想通り CRISPR 耐性変異を獲得したウイルスが増殖したことから、現行薬剤併用療法のように gRNA を組み合わせる使用、HIV の脆弱部位を見つけるといった耐性変異株の出現を抑える工夫が不可欠であると考えられる。

また、ウイルス RNA のシーケンス解析により、以下に示す CRISPR 耐性変異の出現機序が予想される。まず、CRISPR システムによって標的配列の二本鎖 DNA 切断とランダムな indel 変異が誘導された後、その変異が導入されたプロウイルス集団の中から、ウイルス複製能を保持しつつ、CRISPR 耐性変異を獲得したウイルスが選択的に増殖したと考えられる。non functional region を標的とする T295 gRNA 導入細胞ではランダムな indel 変異が導入されても、ウイルス増殖に影響を及ぼさない領域であり、ウイルスが CRISPR 耐性変異を獲得する際に制限を受けなかったため、典型的な indel 変異をもつウイルスが数多く検出されたと考えられる。一方、NF-kB 結合領域を標的とする T6 gRNA 導入細胞では、二つある NF-kB のうち一つを保持したもののだけがウイルス増殖過程で選択され、TAR 標的 T5 gRNA 導入細胞では TAR の RNA 立体構造を保持しつつ、CRISPR 耐性変異を獲得したウイルスが選択されたと考えられる。このことから、本研究で確立した手法をウイルスの複製に必須な部位 (=脆弱部位) を検索するのに有効であることが示された。ウイルス複製に必須な Gag の脆弱部位の検索、すなわち、新たな創薬標的検索方法として期待できる。

## E. 結論

Gag を標的とする HIV 治療法開発の基盤とな

る実験系、1)Gag 蛋白質のライプイメーシング解析系、2)ゲノム編集法を使ったウイルス脆弱部位の検索実験系を構築した。

## F. 知的所有権の取得状況

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ebina H, Kanemura Y, Misawa N, Sakuma T, Kobayashi T, Yamamoto T, Koyanagi Y. A high excision potential of TALENs for integrated DNA of HIV-based lentiviral vector. *PLoS One*. In press.
- 2) 蝦名博貴、小柳義夫. ゲノム編集とエイズ治療. 医学の歩み. 医歯薬出版株式会社, 2015.
- 3) 蝦名博貴、小柳義夫. ゲノム編集技術を用いたエイズ根治療法の可能性. 今すぐ始めるゲノム編集, 羊土社, 2014.

### 2. 学会発表等

- 1) 蝦名博貴: 感染者からのウイルスの除去. 市民公開講座 HIV 感染症の Cure は可能か? -基礎研究者の挑戦. 2014年12月5日(金), 大阪
- 2) 蝦名博貴: ゲノム編集法を用いたエイズ治療戦略の展望. 第28回日本エイズ学会学術集会. 2014年12月3-5日(水-金), 大阪.

3) 蝦名博貴、金村優香、小柳義夫: ゲノム編集法を用いた HIV プロウイルスのライプイメーシングシステムの構築. 第37回日本分子生物学会年会. 2014年11月25-27日(火-木), 横浜

4) Ebina H: Perspective of genome editing technologies for viral diseases. The 27<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology. 2014年11月12-14日(水-金), 小倉.

5) 蝦名博貴、金村優香、三沢尚子、佐久間哲史、小林朋子、山本卓、小柳義夫: TALEN 法による HIV プロウイルスの高編集効果. 第62回日本ウイルス学会学術集会. 2014年11月11-12日(月-水), 横浜.

4) 蝦名博貴: ゲノム編集の HIV への応用、第4回ゲノム編集研究会. 2014年10月6-7日(月-火), 広島.

6) 蝦名博貴: ゲノム編集法を用いたウイルスゲノムの改変~HIV 治療への応用、第8回日本ゲノム微生物学会若手の会. 2014年9月28-29日(日-月), 静岡.

7) 蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫: ゲノム編集法のエイズ治療への展望. 第16回白馬シンポジウム. 2014年6月13-14日(金-土), 熊本.