

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790438

研究課題名(和文) ウイルスヌクレオソーム標識実験法によるウイルス発現調節メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis for chromosomal regulation of HIV gene expression by proviral labeling

研究代表者

蝦名 博貴 (Ebina, Hirotaka)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：60541951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞ゲノムに組込まれたウイルスクロマチンをLacO/LacIシステムにて標識し、ウイルス発現制御メカニズムを明らかにすることである。その第一段階として、ゲノム編集CRISPR/Cas9法を用いたHIVプロウイルス改変技術を確立した。CRISPR/Cas9法を用いることでT細胞の潜伏HIVプロウイルスの改変が可能であることを明らかにした。HIV LTRを標的とすることでウイルスポロモーターの不活性化、ならびに、プロウイルスの抜き取りが可能であることを明らかにした。また、相同組替え修復経路を利用したCRISPR/Cas9法によりHIVプロウイルス相同組替えにも成功した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to understand the chromosomal regulation for HIV expression. We planned to understand the spatial and chromosomal regulation of HIV provirus by using LacO/I system. To apply LacO/I system, Lac O repeat sequence must be inserted into HIV provirus in vivo. Therefore, we explored the potential of CRISPR/Cas9 system to edit HIV-1 genome as the first step. We found that CRISPR/Cas9 system efficiently cleaved and mutated HIV provirus in T cells, resulting in disturbing the expression. Furthermore, we established a new method that induces precise mutation in HIV provirus through HDR repair pathway using CRISPR/Cas9 system. It is suggested that these technologies enable to insert LacO repeat sequence into HIV provirus and have a potential to discover chromosomal regulation of HIV gene expression.

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：分子

キーワード：HIV 潜伏感染 クロマチン ゲノム編集

### 1. 研究開始当初の背景

Human immunodeficiency virus (HIV) の感染に起因する重症免疫不全症(エイズ)は、抗 HIV 剤の併用療法 (HAART) によりその発症と病状進行を大幅に抑えることが可能となった。しかし、未だにウイルスの完全排除は不可能である。HIV 感染初期に形成される長期生存潜伏感染細胞がその原因であるが、そのゲノム潜伏化決定機構は未だ多くのなぞにつつまれている。また、口唇ヘルペスや単純ヘルペス脳炎の原因となる Herpes simplex virus (HSV) に対してはウイルス DNA 合成阻害剤であるアシクロビルが有効であるが、神経節に生ずる潜伏感染型 HSV に対してはまったく無効であり、その完全除去は不可能である。すなわち、ウイルスの潜伏化はウイルスが宿主の免疫機構から逃れる上でも重要であり、そのメカニズムの解明はウイルス感染症の治癒のためにはきわめて重要な命題である

### 2. 研究の目的

細胞核内に侵入するウイルスゲノム DNA は、クロマチンを形成し、細胞のクロマチン制御機構によって不活性化される。一方、ウイルスはそのような抑制機構を解除する機能も有する (Paulus C, Rev Med Virol. 2010; Colin L, Retrovirology. 2009)。すなわち、ウイルスはその両機能を巧妙に使い分ける事により、ウイルス複製とそれに続く潜伏感染成立により生き残り戦略を獲得したと考えられる。しかしながら、その複製と潜伏感染がどのように決定されるのか、その詳細は未だに不明な点が多い。そこで本申請研究では、外来ウイルスゲノムが核内においてどのようにしてクロマチンを形成するのか、そして、その新規に構築されたヌクレオソームは如何に修飾されることで潜伏感染あるいは活性化へ運命づけられるのかを明らかにする。この目的のために、新規に形成されるウイルスクロマチンを特異的に標識する実験系を構築する。

### 3. 研究の方法

HIV プロウイルスクロマチンの標識には、Lac オペレーター(0)/リプレッサー(1)システムを用いる。細胞ゲノムに組込まれた HIV プロウイルス内部配列に Lac0 反復配列(256 コピー)を挿入する。そして、その細胞に蛍光蛋白質 GFP と NLS を融合した Lac I 蛋白質を導入することで、HIV プロウイルスクロマチンを標識する。

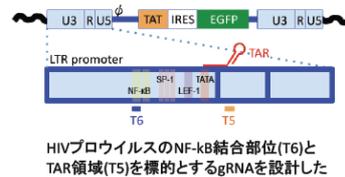
ゲノム編集法(CRISPR/Cas9 法)を用いて HIV プロウイルス内部配列に Lac0 反復配列を挿入する計画とした。そこで、CRISPR/Cas9 法の HIV プロウイルス編集効果を検証するために、HIV LTR の TAR 領域を標的とする gRNA を

設計し、その HIV プロウイルス編集効果を検証した。

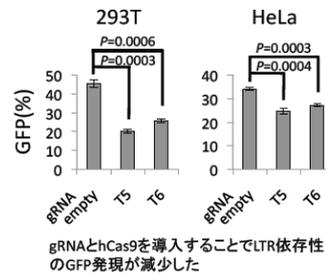
### 4. 研究成果

Tat 依存性に EGFP を発現するレンチウイルスベクター(LTIG)を使ってプロウイルス細胞を作製した。これらに NF- $\kappa$ B 結合部位あるいは TAR 領域を標的とするガイド RNA 発現と humanized Cas9 発現 DNA を導入したところ、EGFP 発現率を効率良く抑制した(図 A, B)。シーケンス解析より CD4 陽性 T 細胞である Jurkat 細胞では、その標的部位の 70-80% において変異導入が確認された。

#### A gRNA の設計

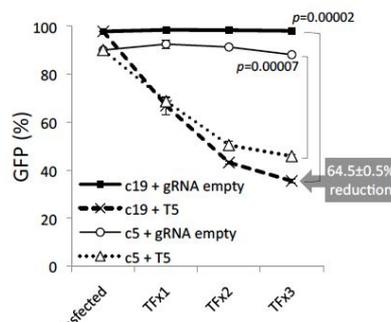


#### B HIVプロウイルス編集効果



非刺激状態では GFP 陰性であるが、TNF- $\alpha$  処理によりほとんどすべて GFP 陽性となる潜伏感染 Jurkat クローン細胞に対して、CRISPR/Cas9 の導入により 60% 以上の細胞において EGFP の発現は見られず、潜伏プロウイルスに対しても有用であった(図 C)。

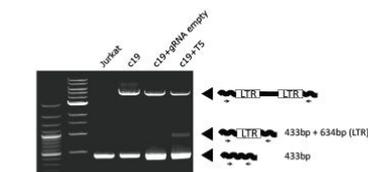
#### C T細胞における潜伏HIVプロウイルスの編集効果



gRNAとhCas9により潜伏HIVプロウイルスを不活性化した。導入を繰り返すことで、64%のプロウイルスが不活性化された。

この LTR 標的 CRISPR/Cas9 システムは、その転写活性抑制作用だけでなく、プロウイルス DNA 数を明らかに減少させたことより、プロウイルスの切り取り活性を有する事がわかった(図 D)。

D HIVプロウイルスの抜き取り効果

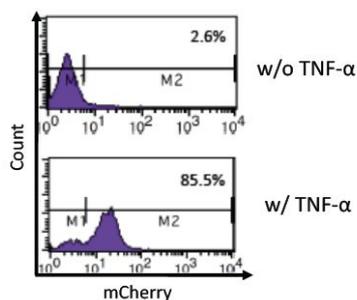


プロウイルス両端に位置するLTRを標的とすることでプロウイルスの抜き取りが確認された。

以上の結果から、HIV プロウイルスはゲノム編集法の標的となることが示された。そこで、HIV プロウイルスを標的として、ゲノム編集法を利用した相同組替えにより、HIV プロウイルスを任意の配列へ変換することが可能かどうかを検証した。

図 A に示した HIV モデルプロウイルスの GFP 領域標的とする gRNA を設計した。Cas9、GFP 標的 gRNA、と共に、プロウイルス相同配列を両端に組込んだ mCherry 遺伝子 DNA を相同組替え修復の鋳型 DNA として HIV 潜伏 T 細胞に導入した。その結果、GFP 発現潜伏 HIV プロウイルスを mCherry 発現潜伏 HIV プロウイルスへと改変することが出来た(図 E)。

E 潜伏HIVプロウイルスの相同組替え



GFP発現潜伏プロウイルスをCRISPR/Cas9法を利用した相同組替えによりmCherry発現潜伏プロウイルスへ改変した。

以上の結果は、ゲノム編集技術を用いることで HIV プロウイルスを任意の配列へと変換可能であることを示しており、現在、HIV プロウイルスへの Lac O 反復配列の挿入実験を行っている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文](計3件)

Ebina H\*, Misawa N, Kanemura Y, Koyanagi Y, Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus., **Scientific Reports**, 査読有, 3: 2013, 2510

Ebina H\*, Kanemura Y, Suzuki Y, Urata K, Misawa N, Koyanagi Y, Integrase-independent HIV-1 infection is augmented under conditions of DNA damage and produces a viral reservoir., **Virology**, 査読有, 427(1): 2012, 44-50

Watanabe T, Urano E, Miyauchi K, Ichikawa R, Hamatake M, Misawa N, Sato K, Ebina H, Koyanagi Y, Komano J\*, The hematopoietic cell-specific Rho GTPase inhibitor ARHGDI1/D4GDI1 limits HIV-1 replication., **AIDS Res Hum Retroviruses**, 査読有, 28(8):2012, 913-22

### [学会発表](計9件)

蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫、Development of the CRISPR/Cas9 system editing for latent HIV-1 provirus., 第 36 回日本分子生物学会年会 2013

蝦名博貴、三沢尚子、金村優香、小柳義夫 ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去、第 27 回日本エイズ学会学術集会 2013

蝦名博貴 ゲノム編集技術による潜伏 HIV プロウイルスの制御と除去、第 3 回ゲノム編集研究会 2013

金村優香、蝦名博貴、小柳義夫. I 型 IFN 発現制御における SAMHD1 の新規機能の解析. 第 36 回日本分子生物学会年会、2013

Ebina H, Kanemura Y, Suzuki Y, Urata K, Misawa N, Koyanagi Y. DNA damage induces illegitimate integration of HIV-1 in the presence of integrase inhibitor, leading to produce a viral reservoir. 37<sup>th</sup> Retroviruses Meeting Cold Spring Harbor, 2012.

蝦名博貴 インテグラーゼ非依存的な HIV cDNA の組込み機構、第 14 回白馬シンポジウム、2012 年

蝦名博貴、金村優香、小柳義夫 生細胞における HIV cDNA の可視化とイメージング、第 35 回日本分子生物学会年会

2012

蝦名博貴、金村優香、小柳義夫 HIV cDNA の可視化とライプイメージングの確立、第 60 回日本ウイルス学会学術集会 2012

金村優香, Peter Gee, 蝦名博貴, 小柳義夫. ウイルス感染により誘導される IFN の発現制御とウイルス複製における SAMHD1 の役割. 第 35 回日本分子生物学年会、福岡、4P-0447、2012年12月

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/virus/ka\\_nsenbyoutai.html](http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/virus/ka_nsenbyoutai.html)

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/KoyanagiHP/saito/TOP.html>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

蝦名 博貴 (EBINA, Hirotaka)  
京都大学 ウイルス研究所 助教  
研究者番号 : 60541951

### (2) 研究分担者