

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860313

研究課題名(和文) HIV-1 インテグラーゼのDNA二重鎖切断部位へのリクルート機構

研究課題名(英文) The recruitment mechanism of HIV-1 integrase to DNA double-strands break sites

研究代表者

飯島 健太 (IIJIMA, KENTA)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：20565626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではHIV-1 インテグラーゼ(IN)のDNA二重鎖切断部位(DSB)へのリクルート機構とIN活性非依存的なDSB部位へのウイルスDNA挿入機構を明らかにすることを目的とした。本研究でDSB部位へのINの迅速なリクルートにはHIV-1 VprのDSB部位へのリクルートが要求されることを明らかにした。またVprのDSB部位へのリクルートにはDSBセンサータンパクであるMre11が要求されることを明らかにし、VprとMre11タンパク間の相互作用は、非相同末端結合を介したDSB修復経路を制御することによりDSB部位への完全長ウイルス挿入を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the integration modes of HIV-1 DNA to the artificially induced DSB site through IN-activity independent mechanism. In this study, we notably found the rapid recruitment of two viral proteins (IN and "A") to the micro-irradiation induced DSB tracks. Surprisingly, the accumulation of IN at the DSB tracks was completely depends on the function of "A". The analysis using DSB-signaling inhibitors show that the recruitment of "A" to DSB site is independent of ATM and DNA-PKcs activities. We found the DSB sensor protein "B" is required for the recruitment of "A", and physically interacts with "A". Along with these data, we found the suppressive role of "A" in one of the cellular DSB repair pathway, NHEJ. Additionally, "A" deficient virus show larger deletions of proviral DNA ends at the DSB /proviral DNA junction, suggesting the requirement of "A" for the intact viral DNA integration at DSB site.

研究分野：分子生物学、ウイルス学、放射線生物学

キーワード：HIV-1 DSB Vpr Integrase

1. 研究開始当初の背景

現在の AIDS 治療は多剤併用による HAART により発症の抑制に成功しているものの、静止期マクロファージのようなリザーバーへの HIV 感染はウイルス排除の障壁となっている。近年ではインテグラーゼ阻害剤の導入により、新規の HIV 感染を効果的に抑えこむことに成功している。その一方で静止期マクロファージへの DNA 損傷の誘導はインテグラーゼ阻害剤存在下においてもウイルス感染効率を増大させることが明らかになっているとともに、生成された DNA 損傷部位は HIV ウィルス DNA の挿入標的となることが報告されている。DNA 損傷は細胞の通常の代謝プロセスにおいても発生する一方で、HIV-1 アクセサリータンパク Vpr により DNA 二重鎖切断 (DSB) が誘導されることから、DNA 損傷に依存したインテグラーゼ阻害剤耐性のウィルス感染機構の解明は AIDS 治療において極めて重要な意義を持つ。申請者は新たな知見として HIV-1 インテグラーゼ (IN) が Vpr 依存的に DNA 損傷部位へとリクルートされることを見出していることから、これらのウィルスタンパクの損傷部位へのリクルート機構を解明し、新規 AIDS 治療薬の開発につなげてゆく。

2. 研究の目的

本研究では IN の活性に依存しない HIV ウィルス DNA の挿入機構の解明を目的としており、近年のインテグラーゼ阻害剤による治療をも回避する HIV 感染の抑制の分子基盤を与えるものである。これまでに、ChIP 法を用いてインテグラーゼが DSB 部位へと集積することを見出し、また Micro- irradiation (μ -IR) による迅速、且つ定量的な IN リクルートメント評価系を既に稼働させており、この独自の検出系により高効率に IN リクルートメントの制御因子を探索することが可能となる。世界的に最も活発な研究分野の 1 つである HIV の研究領域において、DSB 部位への挿入機構に関する研究報告は申請者の研究グループを除いて未だなく、科学的に重要な発見の余地が大いに残されている。また DSB 部位への DNA 挿入は他のウィルス種および、レトロトランスポゾンについても報告されている現象であるが、この分子機序についてはほとんど明らかになっていない。本研究による成果は HIV の新規な挿入機構の解明ということにとどまらず、他のウィルス種、および転移因子の DNA 挿入機構の解明にも寄与することが予想され、生物学的見地からも非常に重要な学術的意義を持つ研究である。さらに本研究より得られる知見はインテグラーゼ阻害剤耐性のウィルス DNA 挿入の抑制剤の開発への展開を可能とし、AIDS 治療という社会福祉的見地からも極めて重要な意義を持つものである。

3. 研究の方法

(1) DSB 部位へのタンパクリクルートの解析:
A. ChIP (Chromatin immunoprecipitation) assay. I-Ppo1 認識部位を含む *DAB1* 遺伝子座について、I-Ppo1 のアデノウィルスを介した強発現後に抗 IN 抗体による ChIP 解析を行った。

B. FRAP (Fluorescence recovery after photo-bleaching) assay。Micro-irradiation (μ -IR) による DSB 誘導部位への EGFP-IN および、Cherry-LacR-Vpr タンパクリクルートの解析を行った。DSB 誘導部位の可視化のために、EGFP-MDC1、-NBS1 を適宜使用した。

(2) HIV-1 感染実験

A. HIV-1 感染効率の測定

HIV-1 ウィルス感染 48 時間後において、Alu-PCR (HIV-1 LTR/ Alu 間での 1st PCR、および、2nd qPCR) により Integration 効率を測定した。

B. DSB 挿入プロウィルス DNA 末端構造の解析
HT1080 細胞に I-Sce1 認識配列を導入した細胞系 (HT1080/ RetroSce1) において、I-Sce1 のアデノウィルスによる強発現後 24 時間で、IN 活性欠損 HIV-1 を感染させた。HIV-1 感染後 48 時間において、ゲノム DNA を抽出し、PCR 増幅後、DSB/プロウィルス DNA 結合末端の塩基配列解析を行った。

(3) DSB 修復効率、および性状の解析:

A. DSB 修復効率の測定

NHEJ (non-homologous end joining) による DSB 修復の測定には U2OS/pEJ、HR (Homologous end joining) による DSB 修復の測定には U2OS/DRGFP を使用した。各レポーターへの DSB 導入は I-Sce1 発現アデノウィルス感染により行った。DSB 修復効率の測定はウィルス感染後 48 時間における GFP 陽性細胞の出現率により評価した。

B. DSB 修復末端構造の解析

U2OS/pEJ において DSB 修復により出現した GFP 陽性細胞を FACS にて分取し、ゲノム DNA を抽出、PCR 後に I-Sce1 による DSB の修復末端構造の塩基配列解析を行った。

(4) Mre11/Vpr タンパク相互作用の解析

コムギ胚芽無細胞タンパク合成系を用いて発現した、FLAG/His-Mre11、および FLAG/Strep-Vpr について精製を行い、各アフィニティービーズを用いて Mre11/Vpr 結合性の解析を行った。

(5) Mre11ヌクレアーゼ活性の測定

大腸菌において発現・精製した FLAG/His-Mre11 タンパクを用いて、2-AP (Aminapurine) 含有ヘアピン DNA に対する

Exonuclease 活性を測定した。遊離 2-AP より得られる蛍光の測定により活性を評価した。

4. 研究成果

本研究では HIV-1 インテグラーゼ (IN) の DNA 二重鎖切断 (DSB) 部位へのリクルート機構と IN 活性非依存的な DSB 部位へのウイルス DNA 挿入機構を明らかにすることを目的としている。

IN は Vpr 依存的に DSB 部位へ集積する

μ -IR により誘導した DSB 部位への IN の迅速なリクルートには HIV-1 アクセサセリタンパクである Vpr の DSB 部位へのリクルートが要求されること、および Vpr と IN が細胞内において相互作用することを明らかにしている。IN の DSB 部位へのリクルート機構を明らかにするために、まず Vpr の DSB 部位へのリクルートを制御する因子の探索を試みた。候補因子の一段階目のスクリーニングとして、DSB シグナル伝達因子の阻害剤を用いて μ -IR により生成した DSB 部位への Vpr のリクルート動態の解析を行ったところ、Vpr の DSB 部位へのリクルートは ATM, DNA-PKcs、およびポリユビキチン化の経路に依存しないことが明らかとなった。このことから、Vpr の DSB 部位へのリクルートは DSB シグナル伝達の最上流、すなわち DSB センサータンパク群に依存していることが示唆されたため、これらのタンパクの 1 つである Mre11 を欠損した細胞 (Ataxia-telangiectasia like disorder: ATLD 細胞) において Vpr の DSB 部位へのリクルートを解析した。その結果、Vpr のリクルートは Mre11 欠損細胞 (ATLD+Vec) においては観察されず、Mre11 の相補細胞 (ATLD+Mre11) においては Vpr のリクルートが回復することが明らかとなった (図 1)。このことからウイルス感染時には DSB センサータンパクである Mre11 依存的に Vpr、および IN が DSB 部位へとリクルートされ、プロウイルス DNA の挿入反応が進行することが予想される。

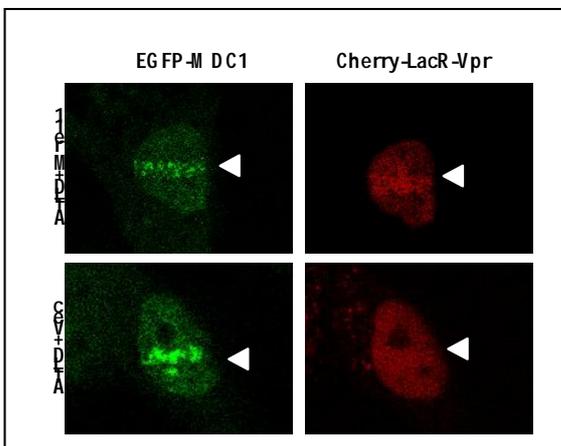


図 1 ATLD、および Mre11 相補 ATLD 細胞における、Vpr の DSB 部位へのリクルート

Vpr は Mre11 との結合性を示し、また Mre11 のエキソヌクレアーゼ活性を抑制する Mre11 と Vpr の *in vitro* および *in vivo* における結合性が確認されたことから、Mre11 とのタンパク間相互作用を介して、Vpr および IN は DSB 部位へと迅速にリクルートされることが示唆された。また、*in vitro* における Mre11 のエキソヌクレアーゼ活性の測定系において Vpr 存在下において、その酵素活性が抑制されることが示された (図 2)。

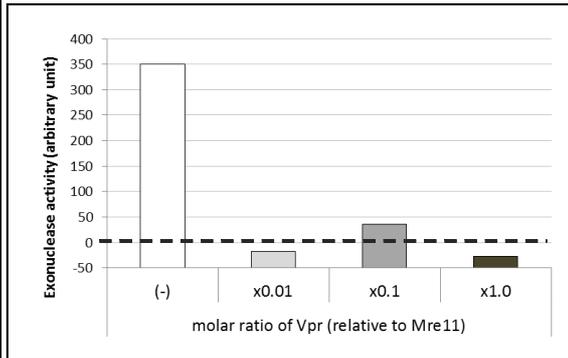


図 2 Vpr は Mre11 のエキソヌクレアーゼ活性を抑制する

Mre11 は新規抗ウイルス宿主因子である

Mre11 の Vpr との相互作用のウイルス学的意義を明らかにするために、ATLD 細胞、および Mre11 相補 ATLD 細胞において HIV-1 感染効率を測定したところ、Mre11 存在下において顕著にウイルス感染が抑制されたことから (図 3)、Mre11 は新規の抗 HIV-1 宿主因子であることが強く示唆された。

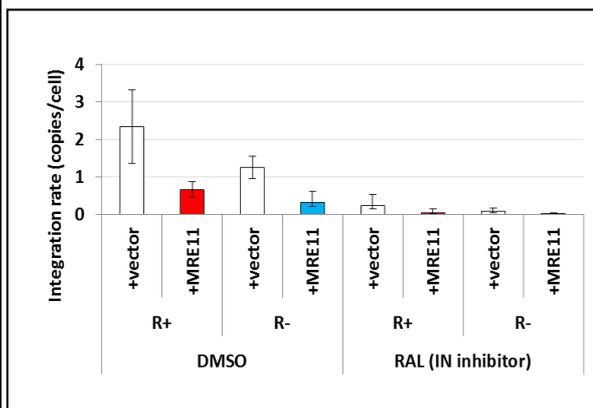


図 3 Mre11 は HIV-1 感染を抑制する

Vpr は IN 活性非依存的ウイルス挿入においてプロウイルス DNA 末端の保護に寄与する Vpr 野生型、および Vpr 欠損型の IN 活性欠損 (IN-D64A) HIV-1 の DSB 部位への挿入形状の解析の結果、Vpr 欠損ウイルスから得られたプロウイルス DNA 末端形状は Vpr 野生型のもの比べて顕著に DNA 配列の欠失程度が大きかったことが明らかになった。このことは Vpr が DSB 部位指向性のプロウイルス挿入においてウイルス末端の分解を抑制し、ウイルス遺伝

情報の保護に寄与していることを示唆すると考えられる。

Vpr は NHEJ による DSB 修復経路を抑制・修飾する

DSB 修復のレポーター細胞において、Vpr 発現下での DSB 修復の効率について解析を行った。その結果、Vpr 発現下においては NHEJ による DSB 修復能が低下していることが明らかとなり、また Vpr による NHEJ の抑制能は Vpr の DSB 部位への集積能と強く関連することが明らかとなった (Vpr-Q65R, R77Q, R80A は DSB 部位へのリクルート能が不全) (図 4)。また DSB 修復の末端性状についても、Vpr 発現下では非発現のものと比較して、明らかに異なるプロファイルが観察された(図 5)。すなわち Vpr 非発現細胞においては単一の DSB 末端の結合パターンのみが出現したのに対し、Vpr 発現細胞では多様なプロセッシングのパターンを示し、特に欠失塩基長の短い産物の顕著な増加が確認された。このことから Vpr は NHEJ に伴う DSB 末端プロセッシング制御に作用していることが示唆された。

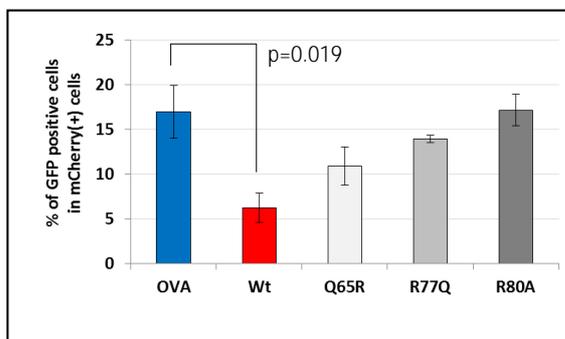


図 4 Vpr は細胞の NHEJ 経路を抑制する

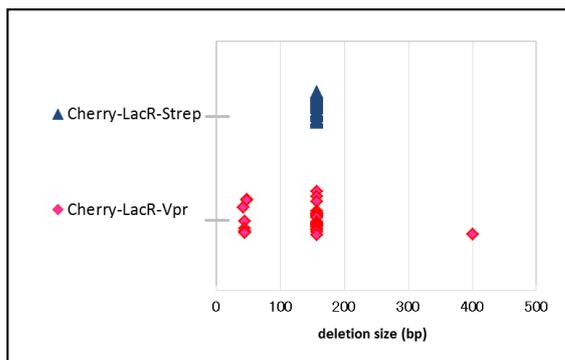


図 5 Vpr は NHEJ における DSB 末端欠失塩基長に關与する

以上のことから、Vpr、および IN は DSB センサータンパク複合体を構成する Mre11 依存的に DSB 部位へとリクルートされ、プロウィルス DNA の DSB 指向的な挿入反応を促進すると考えられる。さらに、Vpr は IN のリクルートに寄与するのみならず、NHEJ 経路、特に DSB 末端プロセッシングを抑制することにより、挿入プロウィルス DNA の遺伝情報の維持に寄

与することが予想される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

飯島健太、HIV-1 Vpr による DNA 二重鎖切断誘導のウィルス感染における役割、第 17 回白馬シンポジウム in 米子、2015,6/20、鳥取県米子市西町

飯島健太、HIV-1 Vpr による DNA 二重鎖切断誘導機構、第 16 回白馬シンポジウム in 熊本、2014,6/13、熊本県熊本市本荘

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯島 健太 (IIJIMA Kenta)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター研究所、難治性疾患研究部、上級研究員
研究者番号：

20565626

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

小林 純也 (KOBAYASHI Junya)

京都大学 放射線生物研究センター、ゲノム動態研究部門、准教授