

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21242

研究課題名(和文) ヒト内在性レトロウイルスの発現機構と役割の解明

研究課題名(英文) The analysis of the mechanisms of HERV-K expression

研究代表者

門出 和精 (MONDE, KAZUAKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：70516137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト内在性レトロウイルス(HERVs)はヒトゲノムの8%を占めている。HERVsは初期胚細胞で発現し、その後発現が制御される。しかし、様々な疾患でHERVsが発現することから病気との関連が注目されている。我々は、HIV-1感染細胞でHERV-KがHIV-1の増殖を抑制することを報告した。HERVsは外来性レトロウイルスの脅威から宿主を守る働きがあるのかもしれない。また、HERVsは転写因子Sox2により活性化され、長期培養によりゲノムを転移することを発見した。このことから、HERVsは発生初期の短期間で重要な役割を担っているが、長期間発現したままだと癌等の疾患につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Human endogenous retroviruses (HERVs), the remnants of ancient retroviral infections, constitute about 8% of human genomic DNA. HERVs are constitutively transcribed in primordial germ cells. Eventually, HERV-K transcription is epigenetically silenced in somatic cells except for in pathological contexts. HERV-K expression is induced by HIV-1-infection in T cells. We found that HERV-K interferes the HIV-1 replication. HERV-K Gag MA, CA and NC are important for reduction of HIV-1 release and infectivity. It is conceivable that HERVs, which have adapted to human for a long time, might have protected the host from the threat of exogenous retroviruses. Our further analysis revealed that Sox2 is essential for the transcription of HERV-K. Interestingly, HERV-K had a retrotransposon activity and moved on the host genomes for a long-term culturing. It suggests that HERV-K is likely to be epigenetically regulated and play a role for development of embryo in short-term period of early development.

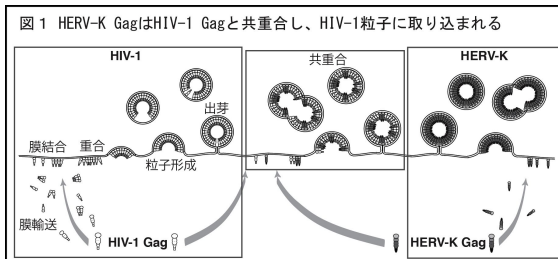
研究分野：ウイルス学

キーワード：HERV-K レトロトランスポゾン 内在性レトロウイルス HIV-1 Gag Sox2

1. 研究開始当初の背景

マウス内在性レトロウイルス *Fv1* は、MLV の侵入後、逆転写、インテグレーションを阻害し、細胞をマウス外来性レトロウイルスから保護している (Michael et al. PNAS 1976)。一方、ヒト内在性レトロウイルス (HERVs) はヒト外来性レトロウイルスから細胞を保護する働きを持つかはわかっていない (Jern et al. Annu. Rev. Genet. 2008)。ヒト内在性レトロウイルスはヒトゲノムの約 8% を占めている。HIV-1 感染者では、HERV-K に対する抗体量が上昇し (Vogetseder et al. AIDS Res Hum Retroviruses 1993)、HERV-K 抗原特異的な CD8+T 細胞の応答が活性化することから (Keith et al. PLoS pathogen. 2007)、HIV-1 感染者に HERV-K が発現する可能性が考えられている。末梢血単核球細胞を用いた *in vitro* の実験では、HIV-1 の感染により HERV-K mRNA の転写が促進され、HERV-K Gag タンパク質の発現が増幅することが報告されている (Contreras-Galindo et al. AIDS Res. Hum. Retroviruses 2007)。HERV-K の発現増幅には、HIV-1 Tat が関与することが近年報告されている (Gonzalez-Hernandez et al. J. Virol. 2012)。またキメラ化 HERV-K 発現ベクターを用いることで、感染性を保持したウイルス粒子の産生に成功し、HERV-K の基礎研究が比較的容易に行えるようになった (Lee et al. PLoS pathogen 2007)。

HIV-1 Gag は T 細胞膜上のリン脂質に結合 (Monde et al. J. Virol. 2011)、重合を経て、HIV-1 粒子を形成する (図 1、左)。一方、HERV-K Gag も同様に細胞膜に結合し、ウイルス粒子を形成する (図 1、右)。HERV-K Gag は HIV-1 Gag とヘテロ結合し、HIV-1 の放出量、感染性を低下することが明らかとなった (Monde et al. J. Virol. 2012) (図 1、中央)。HERV-K Gag は、HIV-1 Gag の重合の初期過程で干渉し、HIV-1 の放出を制御するだけでなく、放出された HIV-1 粒子の形態を異常にする機構が明らかとなった (図 1、中央)。

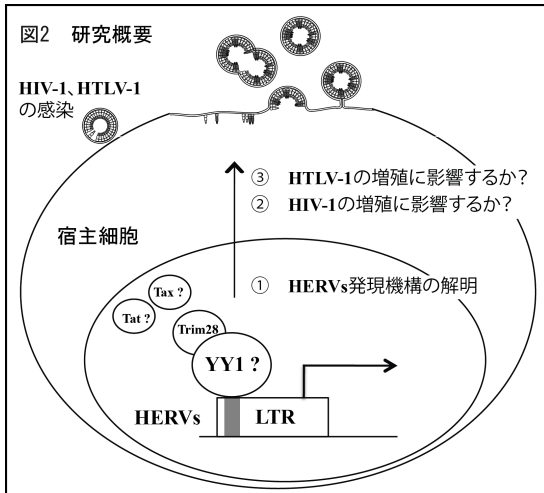


2. 研究の目的

今までの報告から HERV-K Gag は、HIV-1 Gag と同細胞内で共発現すると考えられる。HERV-K 発現ベクターを用いて、強発現させた HERV-K Gag は HIV-1 Gag と細胞膜上で共重合し、HIV-1 粒子の放出を抑制するだけで

なく感染性も低下させた (図 1、中央)。そこで、強発現した場合に限らず、HIV-1 宿主細胞に内在する HERV-K Gag も HIV-1 の増殖に影響を与える可能性が考えられる。そこで本研究では、3つの研究を並行して遂行する。

HIV-1 宿主細胞での HERVs 発現機構を解明する。 HIV-1 感染 T 細胞に内在する HERV-K が HIV-1 の増殖を抑制するか解析する。 HERV-K Gag は、ヒト外来性レトロウイルス HTLV-1 の増殖にも影響するか検討す



る (図 2)。

本研究により、様々な細胞でヒト内在性レトロウイルスの発現を制御する機構が明らかになることができる。様々な細胞でヒト内在性レトロウイルスの発現をコントロールすることができれば、ヒト内在性レトロウイルスが生物多様性、疾患等に対して影響するかについて検討を行うことができる。またヒト内在性レトロウイルスとヒト外来性レトロウイルスの間の干渉を検討することで、レトロウイルスの多様化、宿主細胞との共進化についての新たな知見が得られる。未だ謎の多い内在性レトロウイルスについての研究を進展することは、レトロウイルスが生物多様性に関わった歴史を知るだけでなく、内在性レトロウイルスを利用したウイルス治療、再生医療への応用へと展開する可能性が期待される。

3. 研究の方法

HIV-1 宿主細胞での HERVs 発現機構を解明する。

a) HeLa 細胞、HIV-1 宿主細胞で宿主因子 YY1 が HERVs LTR の転写を抑制するか検証する。

HeLa 細胞、HIV-1 宿主細胞、奇形腫細胞株に発現する YY1 タンパク質、また YY1 と複合体を形成する Trim28 タンパク質等をウェスタンブロットで定量する。細胞に YY1 の結合モチーフを欠損した HERV-K 発現ベクターを導入し、HERV-K LTR の転写活性を調べる。

b) HERV-K LTR の転写に関与する宿主因子の探索する。

HERV-K LTR の転写はさまざまな宿主因子により制御されている。YY1 はそのうちの一つであるが、他にも重要な因子がある可能性がある。そこで未知の因子を探索するために、Microarray を行う。HERV-K LTR の転写が活性化している奇形腫細胞株と不活化している細胞株とで比較し、両者で違いがあるものから転写因子を選択し、HERV-K LTR に影響する因子がどうか同定する。

HIV-1 感染 T 細胞に内在する HERV-K が HIV-1 の増殖を抑制するか解析する。

a) HERV-K ノックダウン T 細胞株で HIV-1 の増殖が加速する機構を解析する。

HERV-K ノックダウン T 細胞で HIV-1 の放出量が増加するかウェスタンブロット、p24 ELISA にて検討する。放出された HIV-1 を標的細胞に感染させ、その感染性が低下するか検討する。HIV-1 粒子を速度勾配法で分離、精製し、粒子の密度、サイズ、Env(gp120)の取り込み量を検証し、電子顕微鏡で成熟粒子を計測する。

b) 末梢血リンパ球、マクロファージ等の HIV-1 宿主細胞で検討する。

末梢血リンパ球、マクロファージに発現する HERV-K を HERV-K shRNA でノックダウンし、HERV-K mRNA 量を定量 PCR 法で解析する。HERV-K ノックダウン細胞で HIV-1 の増殖速度が加速するか p24 ELISA もしくは Reverse transcriptase 法で解析する。HERV-K ノックダウン細胞で HIV-1 の放出量が増加するかウェスタンブロット、p24 ELISA で定量する。

HERV-K Gag は、ヒト外来性レトロウイルス HTLV-1 の増殖にも影響するか検討する。

a) HERV-K Gag と HTLV-1 Gag が共重合するかを検討する。

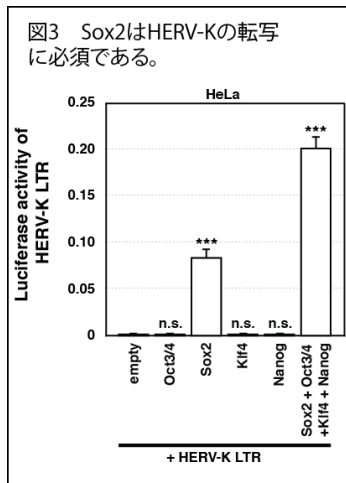
蛍光標識した HERV-K Gag と HTLV-1 Gag を細胞に共発現させ、共焦点レーザー顕微鏡でそれぞれの局在を観察する。HERV-K Gag と HTLV-1 Gag の結合を共免疫沈降法により検討する。

b) HERV-K Gag タンパク質を強発現させ、HTLV-1 の放出が低下するかウェスタンブロットで解析する。 宿主細胞である末梢血リンパ球に発現する HERV-K を shRNA でノックダウンした後、HTLV-1 の放出量、感染性について解析を行う。

4. 研究成果

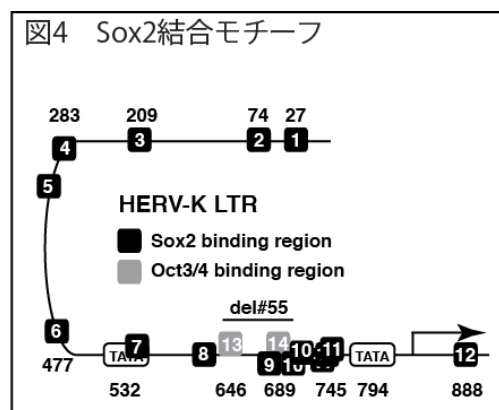
HIV-1 宿主細胞での HERVs 発現機構を解明する。

HERV-K LTR 欠損体を用いて、転写活性を調べた結果、予想と異なり YY1 は転写制御に関与しないことが示唆された。転写活性化には、初期胚細胞で発現する転写因子 Sox2 が必須

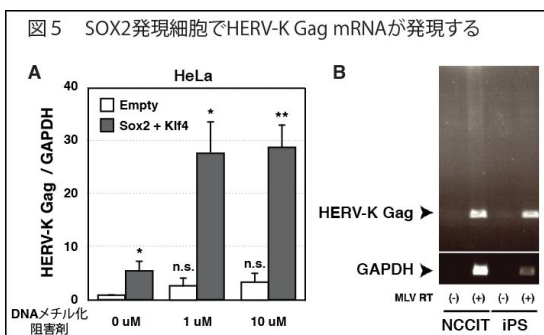


であることが明らかとなった(図3)。また、転写因子 Oct3/4 は Sox2 存在化で、HERV-K の転写を促進することがわかった。興味深いことに、HERV-K

LTR には Sox2 結合モチーフは 12 箇所存在し、1 箇所の欠損では転写活性には影響しないこ



とがわかった(図4)。奇形腫細胞では、内因性の Sox2 が HERV-K LTR に結合していることが ChIP assay により確認できた。また Sox2 の強制発現により、宿主ゲノムの HERV-K の転写が活性化されることが明らかとなった(図5A)。更に、iPS 細胞のような Sox2 発現細胞では HERV-K Gag が高発現することがわかった(図5B)(論文準備中)。Sox2 は初期



胚細胞で発現することから、HERV-K はその時期に何らかの生理的役割を担っている可能性が考えられる。

HIV-1 Tat は HERV-K の転写活性化に関与することで知られているため、Tat が Sox2 の発現に関与する可能性が考えられたが、Sox2 の発現に Tat は影響しなかった。また Tat が Sox2 と競合する可能性も考えられたが、転写

活性化に競合する結果は見られなかった。このことから、Tat は Sox2 非依存的に HERV-K の転写を活性化する可能性が示唆された。

HIV-1 感染 T 細胞に内在する HERV-K が HIV-1 の増殖を抑制するか解析する。

HERV-K ノックダウン T 細胞株をクローニングし、HERV-K Gag mRNA の発現を RT-qPCR で確認したが、予想と異なり HERV-K Gag の発現を効率よくノックダウンすることができなかった。HERV-K は宿主ゲノムに 120 種類以上存在することから、全ての HERV-K Gag をノックダウンするのは困難であることが考えられた。そこで HIV-1 Gag と結合する HERV-K Gag の責任領域を同定する実験へと切り替えた。

HERV-K Gag は HIV-1 Gag と相互作用するが、MLV Gag は HIV-1 Gag と相互作用しないことから、HERV-K と MLV の間に特異性があることが考えられた。そこで、HERV-K Gag と MLV Gag 間でキメラ変異体を用いて解析を行った結果、HERV-K Gag の CA 領域が HIV-1 Gag との相互作用に重要であることがわかった。更に、HERV-K CA の N 末端領域が HIV-1 の放出抑制に関与すること、HERV-K CA の MHR が HIV-1 Gag との共局在に重要であることがわかった (Monde, Retrovirology, 2017)。

HERV-K Gag は、ヒト外来性レトロウイルス HTLV-1 の増殖にも影響するか検討する。

HERV-K Gag と HTLV-1 Gag が共重合するかを共焦点レーザー顕微鏡で観察した。HERV-K Gag は HIV-1 Gag のように HTLV-1 Gag と共局在しないことがわかった。また HERV-K Gag は HTLV-1 Gag と結合しないことが共免疫沈降法によりわかった。更に HTLV-1 の放出に HERV-K Gag は関与しないことがわかった。以上のことから、HERV-K Gag は HIV-1 特異的に干渉し、増殖を抑制する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kazuaki Monde, Yosuke Maeda, Hiromi Terasawa, Yusuke Nakano, Ferri Soheilian, Kunio Nagashima, Akira Ono、Molecular mechanisms by which HERV-K Gag interferes with HIV-1 Gag assembly and particle infectivity, *Retrovirology*、査読有、2017、DOI:10.1186/s12977-017-0351-8
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5406883/>

〔学会発表〕(計 1 1 件)

門出 和精、ヒト内在性レトロウイルスの転写因子の同定、第 18 回日本レトロウイ

ルス研究会、2015 年 07 月 10 日–2015 年 07 月 11 日、名古屋

門出 和精、ヒト内在性レトロウイルスの転写因子の同定、第 52 回日本ウイルス学会九州支部総会、2015 年 09 月 04 日–2015 年 09 月 05 日、大分

門出 和精、Identification of key factors involved in HERV-K transcription、第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日–2015 年 11 月 24 日、福岡

門出 和精、Identification of key factors involved in HERV-K transcription、16th Kumamoto AIDS Seminar、2015 年 10 月 07 日–2015 年 10 月 09 日、熊本

門出 和精、Identification of key factors involved in HERV-K transcription、CSHL Retroviruses、2016 年 5 月 23 日–2016 年 5 月 28 日、Cold Spring Harbor Laboratory, New York

門出 和精、Sox2 is key factor for the expression of HERV-K LTR5-Hs、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2016 年 10 月 23 日–2016 年 10 月 25 日、北海道

門出 和精、Sox2 is key factor for the expression of HERV-K LTR5-Hs、2nd Kumamoto IRCMS International Symposium and 17th Kumamoto AIDS Seminar、2016 年 10 月 31 日–2016 年 11 月 02 日、熊本

門出 和精、Sox2 発現細胞での HERV-K LTR5Hs の発現とレトロトランスポゾン能の解析、第 1 回内在性ウイルス様エレメント研究会、2016 年 12 月 16 日、京都

門出 和精、ヒト内在性レトロウイルスはゲノム上を動くのか?、第 20 回日本レトロウイルス研究会、2017 年 06 月 29 日–2017 年 06 月 30 日、熊本

門出 和精、Analysis of HERV-K retrotransposition in Sox2-expressing cells、第 64 回日本ウイルス学会学術集会、2017 年 10 月 24 日–2017 年 10 月 26 日、大阪

11 門出 和精、Molecular mechanism by which

HERV-K Gag interferes with HIV-1 Gag assembly and particle infectivity, 18th Kumamoto AIDS Seminar, 2017 年 10 月 30 日-2017 年 11 月 01 日、熊本

〔その他〕
ホームページ等

<http://kumadai-bisei.com/>

<http://kumadaivirus.wixsite.com/accountancy-firm-j2>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門出 和精 (MONDE, Kazuaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：70516137

(4) 研究協力者

澤 智裕 (Tomohiro, Sawa)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：30284756

前田 洋助 (MAEDA, Yosuke)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：30284764

小野 陽 (ONO, Akira)
University of Michigan・Department of Microbiology and Immunology・Associate Professor

Kunio Nagashima
Frederick National Laboratory for Cancer Research・Electron Microscopy Laboratory, Leidos Biomedical Research, Inc・Professor