

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15701

研究課題名(和文)新規のインターフェロン誘導性エイズウイルス感染阻害因子の同定

研究課題名(英文) Identification of novel, interferon-inducible anti-AIDS virus host factors

研究代表者

齊藤 暁 (Saito, Akatsuki)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：30621792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、新規のインターフェロン(IFN)誘導性抗エイズウイルス宿主因子を同定することを目的とした。RNA-Seq解析によりIFN処理細胞でのみ特異的に発現レベルが上昇する遺伝子を複数見出し、CRISPR-Cas9法を用いた候補遺伝子のノックアウト細胞作製に取り組んだ。様々な条件検討により、効率よくノックアウト細胞を作製する手法の確立に成功し、既知のIFN誘導性宿主因子ノックアウト細胞ではIFN処理の効果が一部減弱することを明らかにできている。現在、限られた数の候補遺伝子について詳細な評価を進めており、なるべく早い時期に同定に繋がるデータを出したいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、我々を含む国内外の研究グループにより、未同定のIFN誘導性のエイズウイルス感染阻害因子が存在することが示唆されている。近年のオミックス研究の飛躍的な進歩により、遺伝子発現レベルの網羅的解析が比較的容易になってきてはいるが、適切なコントロールがない場合、莫大な量のデータから目的遺伝子を特定するのは容易ではない。我々が今回行ったRNA-Seq実験では、IFN処理によりHIV感染を阻害する細胞でのみ発現レベルが上昇する遺伝子を効率よく抽出できた。現在限られた数の候補遺伝子の評価を進めており、長年解明が求められていたエイズウイルス抑制因子の解明に貢献していきたい。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we sought to identify a novel, type I IFN-inducible anti-HIV host factors in T cells. We performed RNA-Seq analysis using samples of two T cell lines that showed distinct antiviral effect upon IFN treatment. We identified doses of candidate genes upregulated in a cell line that strongly inhibit HIV infection upon IFN treatment. We used the CRISPR-Cas9 system to knockout candidate genes. Our results showed that gene depletion of known antiviral host factors diminished antiviral effect upon IFN treatment. Further screening of candidate genes is now in progress.

研究分野：ウイルス学

キーワード：宿主因子 エイズウイルス インターフェロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

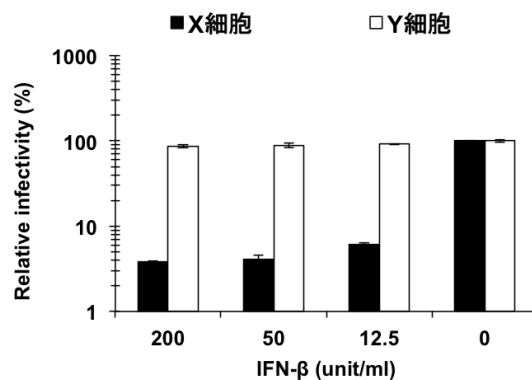
1. 研究開始当初の背景

I 型インターフェロン (以後 IFN とする) は自然免疫の主体であり、様々な宿主因子の発現を誘導することで HIV を含む多くのウイルスの増殖を阻害する。IFN 誘導性の HIV 増殖抑制性宿主因子については、長年その分子の同定と分子機序の解明が待たれていた。この十数年の間に HIV の基礎ウイルス学は大きな進展をみせ、ウイルス感染初期過程の抑制性宿主因子として Mx2 や SAMHD1 など複数の IFN 誘導性因子が同定された。しかしながら、これら報告済みの因子では説明できないウイルス感染阻害が存在することを我々を含む複数のグループが見出している。

2. 研究の目的

本研究では、IFN によって誘導される新規の抗エイズウイルス因子を同定することを目的とした。本研究の発案に先立って、特定の T 細胞株において既知のものではない IFN 誘導性宿主因子が発現していることを強く示唆するデータを得た。重要なことに、この感染阻害には顕著な細胞株特異性がある。図 1 に示すように、X 細胞は IFN 処理により強力に HIV 感染をブロックするが、Y 細胞はほとんど阻害しない。この予備データはターゲット遺伝子を同定していくにあたって強力なアドバンテージであると考えた。上記背景およびこれまでの予備的データを踏まえて、本研究では、未だ解明されていない IFN 誘導性抗レトロウイルス宿主因子の同定に取り組むことにした。

図1. 細胞株によってIFNの効果異なる



3. 研究の方法

(1) RNA-Seq 解析

抗 HIV 効果を持つことがすでに報告されている IFN 誘導性遺伝子については IFN 処理 T 細胞から RNA を抽出し、qRT-PCR により当該遺伝子の mRNA 量を定量した。また、効率的に候補遺伝子を抽出するために、4 サンプル (X 細胞と Y 細胞の IFN 処理有り/無し) を用いて RNA-Seq 解析を行った。

(2) 候補遺伝子の強制発現細胞およびノックアウト細胞の樹立

RNA-Seq 解析により候補としてあがってきた十数個の遺伝子について絞り込みを進めた。本実験では、2 通りの方法でターゲット遺伝子の同定に取り組んだ。1 つ目は、候補遺伝子を哺乳類発現ベクターに導入することで強制発現する実験系の構築を進めた。2 つ目は siRNA を用いて X 細胞における候補遺伝子のノックダウンを行った。さらに、CRISPR/Cas9 システムを用いることで候補遺伝子をノックアウトした X 細胞を樹立した。候補遺伝子ノックアウト X 細胞に IFN 処理を施し、HIV を感染させることで抗ウイルス効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 既知の IFN 誘導性宿主因子の発現パターンの解析

IFN により誘導される抗 HIV 因子の中で、最も強い抑制効果を持つと考えられているのが Mx2 である。そこで、X 細胞と Y 細胞における Mx2 発現レベルについて調べたところ、どちらの細胞においても IFN 処理により約 1,000 倍 mRNA 量が上昇することが判った。また、Mx2 は HIV のカプシド蛋白と相互作用することが知られており、特定のカプシド変異体は Mx2 による感染阻害を回避する。そこで、Mx2 抵抗性カプシド変異体を用いて実験を行ったところ

る、興味深いことに、X細胞におけるIFN感受性は野生型ウイルスよりもむしろMx2抵抗性カプシド変異体の方が高かった。これら一連の結果はX細胞でHIV感染を阻害している分子がMx2ではないことを示唆する。HIVの感染初期過程を阻害する因子としてSAMHD1も知られているが、X細胞で認められる感染阻害にSAMHD1が関わっていないことを示唆する実験データを得た。これら一連のデータは、X細胞で発現している未知の宿主因子がHIV感染を阻害していることを強く示唆するものであった。

(2) IFN処理によりX細胞で特異的に発現レベルが上昇する候補遺伝子の抽出

4サンプル(X細胞とY細胞のIFN処理有り/無し)を用いてRNA-Seq解析を行った結果、IFN処理X細胞でのみ特異的に発現レベルが上昇する数十の候補遺伝子を見出すことができた。また、これまでの予備実験の結果から、未知の因子はHIVの感染初期過程である核移行より前のステップを阻害することを示唆する結果を得ていたことから、候補宿主因子は核内もしくは核膜周囲ではなく、細胞質に局在しているとの予測に基づき、候補遺伝子を十数個まで絞り込んだ。

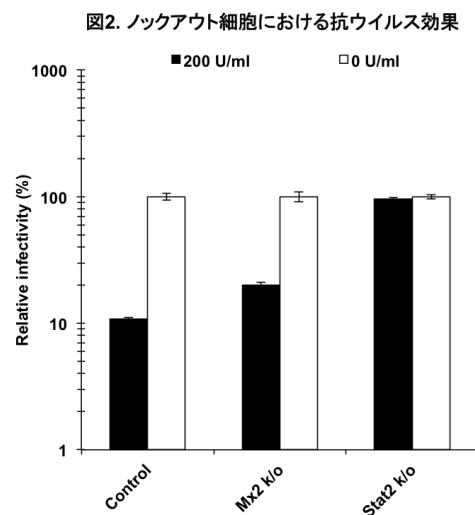
(3) 候補遺伝子ノックアウトX細胞における抗ウイルス効果

十数個の遺伝子について絞り込みを進めた。本実験では、2通りの方法でターゲット遺伝子の同定に取り組んだ。1つ目は、候補遺伝子を発現ベクターに導入することで強制発現する実験系を構築を試みた。一定の数の候補遺伝子の発現が確認できたが、抗ウイルス効果を持つ候補遺伝子は認められなかった。一方で、一部の遺伝子については十分な発現レベルが確認できなかった。このことから、2つ目の方法として、強制発現の実験系ではなく、候補遺伝子のノックダウンもしくはノックアウトによるスクリーニングを進めることとした。

まず、簡便な手法であるsiRNAを用いたノックダウンを試みたが、X細胞はsiRNAの導入効率が極めて低く、複数の導入法を検討したが効果の検証に必要な導入効率を確保することができ

なかった。そこで、CRISPR/Cas9システムを用いることで候補遺伝子をノックダウンしたX細胞を樹立することとした。様々な条件検討により、効率よくノックアウト細胞を作製する手法の確立に成功した。すでに複数の宿主因子についてのノックアウト細胞の作製を済ませており、例えばIFNによる抗ウイルス効果発揮における必須因子であるSTAT2をノックアウトしたX細胞ではIFN処理の効果が完全にキャンセルされること、また既知のIFN誘導性宿主因子であるMx2ノックアウト細胞ではIFN処理の効果が一部減弱することを明らかにできた(図2)。現在数個の候補遺伝子について評価を進めており、なるべく早い時期に同定に繋がるデータを出せることを期待している。

また、私たちは最近、高いIFN抵抗性を示すカプシド変異体の獲得に成功している(論文投稿中)。本研究において、X細胞におけるIFN感受性を調べたところ、X細胞においても野生型ウイルスと比較して高いIFN抵抗性を示した。このことは、当該カプシド変異体はX細胞においてもIFN誘導性宿主因子から回避している可能性が示唆された。さらに、野生型ウイルスをIFN処理X細胞で馴化させることでIFN抵抗性ウイルスの出現を誘導する実験を行った。本実験ではIFN濃度を徐々に上げていくことでIFN抵抗性ウイルスの獲得を目指したが、抵抗性ウイルスを得ることはできなかった。このことはIFN処理X細胞での野生型ウイルスへの高いプレッ



シャーが存在することを示唆すると考えている。今後、これらの研究成果に基づき、IFN 存在下での HIV と宿主との攻防について更なる検討を進めていきたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

(1) Siddiqui MA, **Saito A**, Halambage UD, Ferhadian D, Fischer DK, Francis AC, Melikyan GB, Ambrose Z, Aiken C, Yamashita M. A novel phenotype links HIV-1 capsid stability to cGAS-mediated DNA sensing. **J Virol**. 2019 Jun 5. pii (in press): JVI.00706-19. doi: 10.1128/JVI.00706-19. 査読有

(2) **Saito A**, Ode H, Nohata K, Ohmori H, Nakayama EE, Iwatani Y, Shioda T. HIV-1 is more dependent on the K182 capsid residue than HIV-2 for interactions with CPSF6. **Virology**. 2019;532:118-126. doi: 10.1016/j.virol.2019.04.012. 査読有

(3) Fischer DK, **Saito A**, Kline C, Cohen R, Watkins SC, Yamashita M, Ambrose Z. CA Mutation N57A Has Distinct Strain-Specific HIV-1 Capsid Uncoating and Infectivity Phenotypes. **J Virol**. 2019;93(9): e00214-19. doi: 10.1128/JVI.00214-19. 査読有

(4) Nakayama EE, **Saito A**, Sultana T, Jin Z, Nohata K, Shibata M, Hosoi M, Motomura K, Shioda T, Sangkitporn S, Loket R, Saeng-Aroon S. Naturally Occurring Mutations in HIV-1 CRF01_AE Capsid Affect Viral Sensitivity to Restriction Factors. **AIDS Res Hum Retroviruses**. 2018;34(4):382-92. doi: 10.1089/AID.2017.0212. 査読有

(5) Furuta R, Yasunaga JI, Miura M, Sugata K, **Saito A**, Akari H, Ueno T, Takenouchi N, Fujisawa JI, Koh KR, Higuchi Y, Mahgoub M, Shimizu M, Matsuda F, Melamed A, Bangham CR, Matsuoka M. Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. **PLoS Pathog**. 2017;13(11):e1006722. doi: 10.1371/journal.ppat.1006722. 査読有

〔学会発表〕(計13件)

(1) **齊藤暁**. HIV-1 カプシドによる I 型インターフェロン感受性の制御, 第 32 回日本エイズ学会学術集会・総会, 2018 年

(2) **Saito A**, Mamede JI, Sultana T, Ode H, Iwatani Y, Nakayama EE, Shioda T, Hope TJ. Mutations in viral capsid modulate IFN- sensitivity of HIV-1, Cold Spring Harbor Laboratory 43rd annual meeting, 2018 年

(3) **Saito A**, Mamede JI, Sultana T, Nohata K, Nakayama EE, Shioda T, Hope TJ. The Q4R mutation specifically accelerates kinetics of reverse transcription and initiation of uncoating of IFN- hypersensitive HIV-1 capsid mutant, 第 66 回日本ウイルス学会学術集会, 2018 年

(4) **Saito A**, Mamede JI, Sultana T, Ode H, Iwatani Y, Nakayama EE, Shioda T, Hope TJ. Mutations in viral capsid modulate IFN- sensitivity of HIV-1, U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, 2018 年

(5) **Saito A**, Mamede JI, Sultana T, Ode H, Iwatani Y, Nakayama EE, Shioda T, Hope TJ. Mutations in viral capsid modulate IFN- sensitivity of HIV-1, U.S.-Japan Cooperative Medical Sciences Program (USJCMSP) 20th International Conference on Emerging Infectious Diseases (EID) in the Pacific Rim, AIDS and Immunology Joint Panel, 2018 年

(6) **齊藤暁**, 大出裕高, 野畑享太郎, 大森久樹, 中山英美, 岩谷靖雅, 塩田達雄. カプシド

182番目アミノ酸残基のCPSF6結合への寄与はHIV-1とHIV-2で異なる, 第32回日本エイズ学会学術集会・総会, 2018年

(7) Nohata K, Saito A, Ode H, Nakayama EE, Iwatani Y, Shioda T. Distinct role of the 182th amino acid residue between HIV-1 and HIV-2 capsids in CPSF6 binding, 第66回日本ウイルス学会学術集会, 2018年

(8) Saito A, Sultana T, Ode H, Iwatani Y, Nakayama EE, Shioda T. Mutations in viral capsid modulate IFN- sensitivity of HIV-1, 第16回あわじしま感染症・免疫フォーラム, 2017年

(9) Sultana T, Saito A, Ode H, Iwatani Y, Nakayama EE, Shioda T. Mutations in viral capsid modulate IFN- sensitivity of HIV-1, 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年

(10) Seki Y, Saito A, Satou Y, Harada S, Yoshimura K, Ode H, Iwatani Y, Ishii H, Saiful I, Yoshida T, Washizaki A, Murata M, Yasutomi Y, Matano T, Miura T, Akari H. Characterization of macaque-tropic HIV-1 Long-term Latent infection in Cynomolgus macaque, 第65回日本ウイルス学会学術集会, 2017年

(11) 齊藤暁, Tahmina Sultana, 大出裕高, 岩谷靖雅, 中山英美, 塩田達雄. カプシド領域の変異はHIV-1のIFN感受性を制御する, 第31回日本エイズ学会学術集会・総会, 2017年

(12) 関洋平, 齊藤暁, 佐藤賢文, 原田恵嘉, 吉村和久, 大出裕高, 岩谷靖雅, 石井洋, Saiful Islam, 芳田剛, 村田めぐみ, 鷲崎彩夏, 保富康宏, 俣野哲朗, 三浦智行, 明里宏文. カニクイザルにおけるHIV-1mt長期潜伏感染の解析, 第31回日本エイズ学会学術集会・総会, 2017年

(13) Bi-functional entry inhibitors sensitize macaque-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1mt) to antibodies generated in HIV-1mt-infected macaques. Harada S, Hikichi Y, Seki Y, Saito A, Yoshida T, Ode H, Iwatani Y, Yasutomi Y, Miura T, Matano T, Akari H, Yoshimura K. 35th Annual Symposium on Nonhuman Primate Models for AIDS, 2017年