

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月1日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390136

研究課題名（和文） ウイルス複製に必要な細胞因子の同定と解析

研究課題名（英文） Identification and characterization of host factors required for virus replication

研究代表者

山岡 昇司（YAMAOKA SHOJI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90263160

研究成果の概要（和文）：エイズの原因ウイルスであるヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)の複製を制御する細胞因子を、独自に開発した発現クローニング法で二つ発見した。1件は RNA から DNA が複製される段階、1件はウイルス DNA が核内に侵入する段階に関わっていた。両者とも細胞の増殖には大きな影響を与えずにウイルスの複製を阻害できるので、HIV-1 感染症治療の有力な分子標的候補となる可能性がある

研究成果の概要（英文）：Two host cell factors were identified that regulate the replication of HIV-1, the causative agent of AIDS. One is involved in the reverse transcription stage, while the other is potentially involved in the nuclear translocation stage. The fact that these host factors did not affect cell growth implicates these factors as a potential therapeutic target for treatment of HIV-1-infected individuals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：ウイルス複製、ウイルス、細胞因子、HIV、複製

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは、細胞由来因子を利用して複製する一方で、細胞が備えているウイルス複製を抑制する機構から逃れるためこれに打ち勝つ戦略も有している。感染細胞中で細胞因子がウイルスの複製に促進的に機能するメカニズムは、（1）ウイルス蛋白質あるいは核酸の複合体に直接あるいは間接に作用する場合と、（2）ウイルス感染に伴うインター

フェロン(IFN)などの抗ウイルス自然免疫系の発動を抑制的に制御する場合、に大別できる。

ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV-1)は有効な薬物治療法が開発されたにもかかわらず、その変異による薬剤耐性ウイルス出現と薬剤の副作用が重大な問題となっており、ウイルス複製に必要な細胞因子を標的とした新たな治療法を確立することが切望されている。

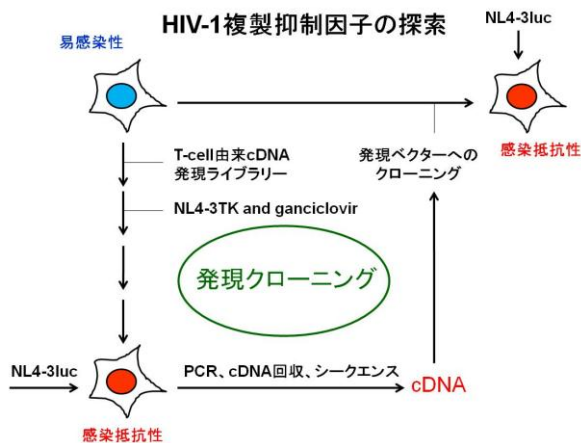
HIV-1 ライフサイクルを支える細胞因子として現在、Cyclin T、TSG101 の他に LEDGF、Crm1 などが知られ、その他に網羅的ノックダウン解析によってその候補分子も最近増えてきているが、残念ながらその作用機構が明らかにされたものは少なく、薬剤標的として治療応用された例はまだない。一方、HIV-1 感染によって細胞の IFN 産生はほとんど影響を受けないが、それはウイルス核酸による細胞刺激が弱いためか、HIV-1 が IFN 産生刺激伝達系を抑制しているのかは未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ウイルス複製をサポートする細胞因子を見出しその作用を詳細に解析することにより、それらを分子標的とした新規抗ウイルス戦略の展開に必要な基盤的知見を築くことにある。具体的には、HIV-1 感染に必要な新規細胞因子の同定と作用機序の解明を目標とする。

3. 研究の方法

発現クローニング法を用いる遺伝学的手法により、HIV-1 感染制御因子をクローニングする。細胞遺伝子の発現を改変した後に HIV-1 感染感受性が低下した細胞から遺伝子情報を回収する。当初の計画では、ウイルスベクターによる遺伝子の無差別破壊の後に HIV-1 感染感受性が低下した細胞株を樹立する計画であったが、研究期間中に細胞遺伝子の発現の改変方法として cDNA 発現ライブラリーを用いて有力な新規 HIV-1 複製補助



因子が得られたため、計画に記載した細胞遺伝子発現改変方法を変更して研究を展開した。具体的には、以下の方法によって、目的の遺伝子を発見した。

- (1) レトロウイルスベクターを用いたヒト T 細胞株由来 cDNA 発現ライブラリーをヒト腎臓由来 293 細胞株に導

入し、cDNA 発現細胞プールを作製する。

- (2) 単純ヘルペスウイルス由来 Thymidine kinase (HSV-TK) を発現する HIV-1 ベクターを感染させ、HSV-TK 依存性に毒性を発揮する ganciclovir 存在下で非感染生存細胞を選別する。
- (3) 上記選別を 4~5 回繰り返すことにより、HIV-1 が感染しにくい細胞が大多数を占めるような細胞プールを樹立する。
- (4) 同プールからクローン化した細胞が HIV-1 に感染しにくいことが確認できれば、その細胞ゲノムに導入されたレトロウイルスベクター上の cDNA を PCR で増幅・単離してクローニングし、その DNA 配列を決定する。
- (5) 単離した cDNA を再度レトロウイルスベクターに組み込んでヒト細胞株で発現させ、実際に HIV-1 感染性を低下させる能力があることを確かめる。
- (6) cDNA を発現する細胞で HIV-1 複製のどの過程に問題が生じているかをウイルス由来逆転写産物 DNA の定量 PCR で解析する。
- (7) 発見した cDNA がコードする蛋白質が HIV-1 複製を阻害するメカニズムを解明し、同蛋白質の HIV-1 複製における役割を解明する。

4. 研究成果

発現クローニングによって、再現性をもって 2 種類の cDNA が強力に HIV-1 の複製を阻害することを発見した。

(1) cleavage and polyadenylation factor 6 (CPSF6) のカルボキシル末端欠損変異体

MT1 細胞由来 cDNA ライブラリーを発現し度重なる NL4-3TK ウイルス曝露後も感染せず生存した細胞クローンにおいてレトロウイルスベクターに挿入され発現していた cDNA は、CPSF6 のアミノ末端 375 アミノ酸からなるポリペプチド hCPSF6-375 であった。

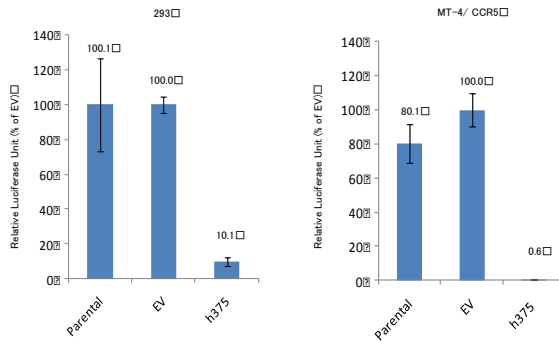
CPSF6 (Full Length) N- [RRM] [Pro-rich] [Charged domain] -C

hCPSF6-375 N- [RRM] [Pro-rich] -C

CPSF6 (Full length) および発現しているポリペプチド (hCPSF6-375) の模式図

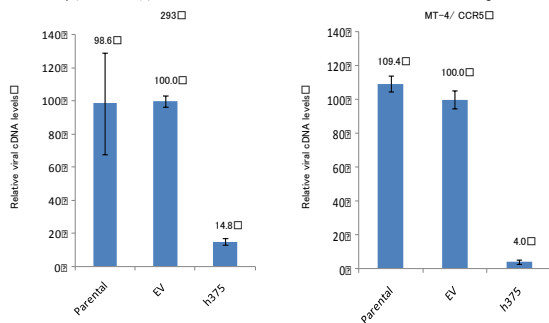
RRM は、RNA Recognition Motif を表しており、Pro-rich は、Proline-rich region を表している。

アミノ末端、カルボキシル末端にインフルエンザウイルス赤血球凝集素(HA)エピトープを付加したポリペプチドを単独で 293 細胞、Jurkat 細胞、MT4/CCR5 細胞に発現させ、HIV-1 ベクターとしてシングルラウンド感染を起こす VSVG-pseudotyped NL4-3luc ウイルスを感染させた場合、HIV-1 の複製は強力に抑制された。



hCPSF6-375 発現細胞を標的としたシュードタイプ HIV-1 の感染実験。EV, CPSF6 m358, h375 を安定的に発現している 293 もしくは MT-4/CCR5 細胞に、VSVG/NL4-3 luc ウイルスを感染させた。感染 20 時間後に細胞を回収し細胞抽出液中の luc 活性を測定。Bradford 法にて測定したタンパク量で補正後、EV に対する Relative Luciferase Unit (RLU) を表した。Parental は正常細胞を、EV はレトロウイルスベクター骨格コントロール細胞を、h375 は hCPSF6-375 安定発現細胞を表す。

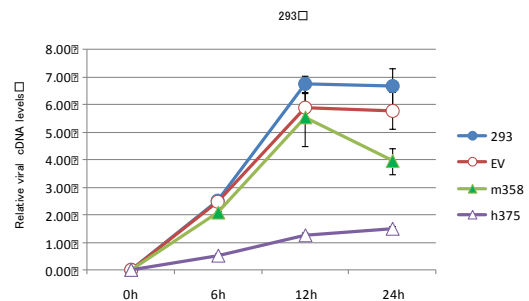
この感染阻害がウイルス複製のどの段階で生じているのかを知る目的で、ウイルス感染後の逆転写によるウイルス DNA 合成過程をモニターできる定量 PCR 実験を行った。逆転写がほぼ完了する段階のウイルス DNA を増幅・定量したところ、hCPSF6-375 発現細胞では逆転写の結果生成するウイルス DNA 量が著しく減少していることがわかった。



HIV-1 ベクター感染後のウイルス DNA 合成量の比較。VSVG/NL4-3 luc ウイルス感染 6 時間

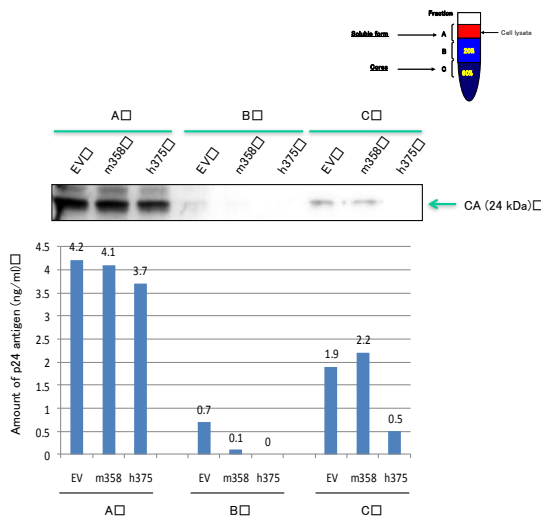
後に DNA を抽出し、ウイルス cDNA の後期逆転写産物量を定量 PCR (qPCR) 法にて *U5-gag* 領域について測定した。ウイルス cDNA 量は内部コントロールとして qPCR 法にて β -globin 量で補正後、EV に対する相対量で表した。

これらの実験がほぼ終了した時点で米国の Kewalramani らのグループから、マウスおよびヒト CPSF6 のアミノ末端 358 アミノ酸からなるポリペプチドが、HIV-1 の逆転写は阻害しないが逆転写産物の核移行を阻害するという報告がなされた。逆転写を阻害しないという点が我々の結果と異なるので、我々も mCPSF6-375 を作製して HIV-1 感染後にウイルス DNA を定量したところ、やはり mCPSF6-375 が逆転写は阻害しないことが判明した。



HIV-1 ベクター感染後のウイルス DNA 合成量の比較。VSVG/NL4-3 luc ウイルス感染 6、12、24 時間後に DNA を抽出し、ウイルス cDNA の後期逆転写産物量を定量 PCR (qPCR) 法にて *U5-gag* 領域を測定した。ウイルス cDNA 量は内部コントロールとして qPCR 法にて β -globin 量で補正後、EV に対する相対量で表した。m358 は、murine CPSF6-358 安定発現細胞を表している。

この事実は、mCPSF6-358 と hCPSF6-375 では HIV-1 への作用が異なることを意味している。その点を明らかにする目的で、逆転写が進行する場であるコアの状態を Fate of capsid assay と呼ばれる sucrose cushion を用いた密度勾配遠心で評価した。hCPSF6-375 が発現する細胞では、感染後 8 時間で capsid 蛋白質の多量体であるコアの量が減少していることがわかった。この結果は、hCPSF6-375 発現はコアの崩壊を促進し、その結果として逆転写が阻害されることを強く示唆する。



hCPSF6-375 を発現する感染細胞内での HIV-1 コアの安定性。EV, CPSF6 m358, h375 を安定的に発現している 293 細胞に VSVG/NL4-3 luc ウイルスを加えた後に 4°C で 30 分静置し、37°C にて 8 時間感染させた。回収した細胞溶解液を、スクロースの 20%-60% step gradient 溶液に重層し、超遠心で分離した。分離後上部 (a)、中部 (b)、20-60% の境界にあたる下部 (c) に分けた後、CA 蛋白に対するウエスタンブロッティング (上段) を行い、CA (p24) 量を ELISA にて定量した (下段)。

以上の結果から、我々が見出した hCPSF6-375 は mCPSF6-358 と異なり、HIV-1 コアの崩壊を促進することで複製を逆転写段階で阻害することがわかった。

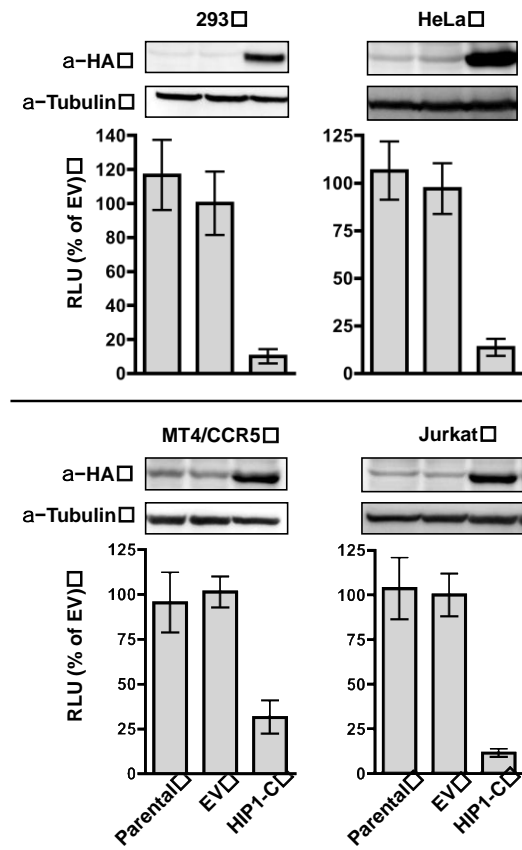
(2) HIV inhibitory protein 1 (HIP1) のアミノ末端欠損変異体

Jurkat 細胞由来 cDNA ライブラリーを発現し度重なる NL4-3TK ウイルス曝露後も感染せず生存した細胞クローンにおいてレトロウイルスベクターに挿入され発現していた cDNA は、HIP1 のカルボキシル末端 375 アミノ酸からなるポリペプチド HIP1-C であった。



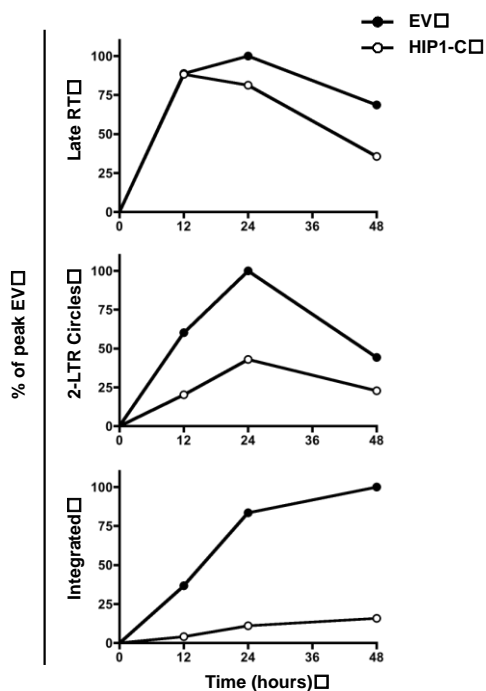
アミノ末端、カルボキシル末端にインフルエンザウイルス赤血球凝集素 (HA) エピトープを付加した HIP1-C を単独で 293 細胞、Jurkat 細胞、MT4/CCR5 細胞に発現させ、HIV-1 ベクターとしてシングルラウンド感染

を起こす VSVG-pseudotyped NL4-3luc ウイルスを感染させた場合、HIV-1 の複製は強力に抑制された。



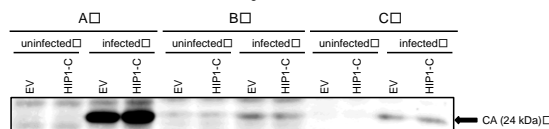
HIP1-C 発現細胞を標的としたシュードタイプ HIV-1 の感染実験。各細胞における HIP1-C 発現 (anti-HA)、および内在性タンパクを検出するため Tubulin 発現 (anti-Tubulin) をウエスタンブロッティングにて確認した結果と、VSVG/NL4-3 luc ウイルスを各細胞に感染させ、ルシフェラーゼアッセイを行った結果 (相対的ルシフェラーゼ活性: RLU) として示している。Parental は正常細胞を、EV はレトロウイルスベクター骨格コントロール細胞を、HIP1-C は HIP1-C 安定発現細胞を表している。

この感染阻害がウイルス複製のどの段階で生じているのかを知る目的で、ウイルス感染後の逆転写によるウイルス DNA 合成過程をモニターできる定量 PCR 実験を行った。逆転写がほぼ完了する段階のウイルス DNA を増幅・定量したところ、HIP1-C 発現細胞では逆転写の結果生成するウイルス DNA 量がコントロール細胞とほとんど変わらないこと、ウイルス DNA が核内に侵入してから生成するとされる 2 LTR form および組み込み型プロウイルス量が著しく減少していることがわかった。



定量PCR法 (quantitative-PCR) を用いた 293 細胞内におけるウイルス DNA 合成効率の定量。上段は、逆転写反応の産物量について HIV-1 の U5-gag 領域を定量した結果を示しており、中段は、HIV-1 cDNA が核内移行した際に形成されるウイルス DNA (2LTR form) を定量した結果を示しており、下段は、染色体に組み込まれたウイルス DNA (integrated form) を定量した結果を示している。EV はレトロウイルスベクター骨格コントロール細胞を、HIP1-C は HIP1-C 安定発現細胞を表す。

この事実は、HIP1-C が逆転写産物の核移行を阻害している可能性を示唆している。Fate of capsid assay では、HIP1-C が発現する細胞では、HIV-1 感染後 4 時間および 8 時間で capsid 蛋白質の多量体であるコアの量はコントロール細胞と比較してほとんど変化がないことがわかった。



HIP1-C を発現する感染細胞内での HIV-1 コアの安定性。EV, HIP1-C を安定的に発現している 293 細胞に VSVG/NL4-3 luc ウイルスを加えた後、4°C で 30 分静置し、37°C にて 6 時間感染させた。6 時間後に回収した細胞溶解液を、スクロースの 20%-60% step gradient 溶液に重層し、超遠心で分離した。分離後上部 (A)、中部 (B)、20-60% の境界にあたる下部 (C) に分けた後、CA 蛋白質に対するウエスタンブロッティングを行った。

以上の結果から、我々が見出した HIP1-C は、HIV-1 の複製を核移行段階で阻害することがわかった。HIP1-C は、核移行シグナルを欠くため本来の局在である核膜には局在せず細胞質で微慢性に存在する。もし HIP1-C が HIV-1 による核膜孔認識に必要な部分を含むならば、その部分に限っての細胞質内での微慢性発現は HIV-1 による核膜孔認識を妨げる可能性がある。

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 3 件)

- (1) 堀 恭徳, 武内 寛明, 佐久間 龍太, 山岡 昇司: ヒト CPSF6 の C 末欠損体は HIV-1 感染後の逆転写効率に影響をおよぼす因子である. 第 60 回日本ウイルス学会学術集会, 大阪, 2012 年 11 月
- (2) 堀 恭徳, 大迫 美穂, 山岡 昇司: ヒト CPSF6-375 は HIV-1 の逆転写産物精製を阻害する. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 2010 年 11 月
- (3) 山岡昇司, HIV-1 複製を阻害する cDNA の単離と解析, 第 57 回ウイルス学会, 2009 年 10 月, 東京

[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://molv.org/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岡 昇司 (YAMAOKA SHOJI)
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研
究科
研究者番号 : **90263160**

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :