

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790450

研究課題名（和文） Rac2 発現の制御機構及び Rac2 依存的抗 HIV-1 感染機序の解明

研究課題名（英文） Analysis of *rac2* gene expression and its role on anti-HIV-1 restriction

研究代表者

博多 義之（HAKATA YOSHIYUKI）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：30344500

研究成果の概要（和文）: HIV-1 感染感受性には個人差がある。*rac2* 遺伝子は感染抵抗性遺伝子であり、Rac2 の発現が高いヒトはより感染抵抗性になる。本研究では Rac2 高発現を制御する 1 塩基を同定した。また、Rac2 の高発現により感染に必須の HIV-1 受容体 CCR5 の発現が減少し、かつ感染阻害活性を持つ CCL5 の発現が上昇すると分かった。以上から Rac2 高発現タイプの塩基配列を持つヒトでは HIV-1 が細胞へ結合しにくくなり感染抵抗性になると考えられる。

研究成果の概要（英文）: Several genetic variations have been identified as factors which affect HIV-1 infection in human. We have recently discovered that human *rac2* gene is one of the restriction genes for HIV-1 infection and individuals who possess high-expression type *rac2* allele in their genome tend to be more resistant to HIV-1 infection as compared to people with low-expression type *rac2* gene allele. During the term of this grant, we identified a single nucleotide polymorphism controlling Rac2 expression in an intron region of the *rac2* gene. We found that Rac2 decreases CCR5 expression, a critical co-receptor for HIV-1 infection, at transcriptional level but increases CCL5 which binds to CCR5 and inhibits HIV-1 infection. These results suggest that higher Rac2 expression affects the HIV-1-cell interaction, leading to more resistant against HIV-1 infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：HIV-1 感染抵抗性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

（1）HIV-1 感染後、HIV-1 を完全に体内から排除する方法はなく、発症したエイズを根治する方法も存在しない。これまでに HIV-1 感染者に対して用いられている抗レトロウイルス薬による多剤併用療法は、ウイルス

複製を効率的に抑えることでエイズ発症遅延に効果を発揮しているが、ウイルスの完全排除ができない理由から、抗ウイルス薬の服用を中断した場合ウイルスの複製が再開し、エイズ発症の経過をとる。このことは抗レトロウイルス薬による複製抑制下でも HIV 排除

に繋がる免疫応答は誘導できないことを示す。従って、発症を遅らせるためには長期におよぶ持続的投薬が必要となり、そのことが多剤併用療法下の多くの感染者にとって深刻な副作用の原因となっている。さらに多剤併用療法下において耐性ウイルスの出現事例が報告され、既存の薬剤では将来ウイルス複製が抑制できなくなる可能性が顕在化している。そのため新たな作用機序を持つ低分子抗ウイルス薬の開発が重要な課題となっている。また近年ヒトにおける候補ワクチンの大規模な評価の結果、それらは感染防御能を誘導できないことが明らかとなり、ワクチン開発には強力な免疫賦活化法の確立が必要であると示唆された。新規抗 HIV-1 薬の開発または免疫賦活化法の確立のために、HIV-1 感染動態を左右する宿主因子の同定およびウイルス感染時におけるその作用機序を理解する事が現在の急務となっている。

HIV-1 感染者の中には感染後、未治療下で長期間にわたりエイズを発症しない発症抵抗者集団が存在する。また、感染が成立する高い頻度で非防御的な性接触を繰り返しているにもかかわらず感染が成立していない集団が、HIV 曝露非感染者群として知られている。HIV 曝露非感染者からはウイルスゲノムおよび HIV-1 に特異的な抗 IgG 抗体が検出されない。一方で HIV-1 抗原反応性を持つ IgA 抗体および T 細胞が認められる。上記集団のエイズ発症または感染そのものに対する抵抗性は、主に各人の遺伝的要素に依存すると考えられており、実際にサイトカイン、ケモカイン及びそのレセプターなどの遺伝的多型の関与が報告されている。しかし、これまでに報告された遺伝的多型では全ての症例を説明できない。従って、HIV 曝露非感染者と感染者のゲノム情報を比較解析する事により、感染・発症抵抗性に関与する更なる遺伝的背景の分子実体を発見できると期待されている。

これまでに我々は、HIV 曝露非感染者と感染者におけるヒト第 22 染色体領域のゲノム配列の比較解析から HIV 曝露非感染者群に高頻度で出現する遺伝子多型を *rac2* 遺伝子領域に発見していた。さらに HIV 曝露非感染者と感染者の末梢血単核球 (PBMC) を採取し HIV-1 構成成分で刺激した結果、*rac2* 遺伝子は HIV 曝露非感染者でのみ初期の発現が増強した。その後 *rac2* 遺伝子を含む近傍のゲノム領域の多型解析から HIV-1 曝露非感染者群に集中する互いに連鎖した 3 箇所の一塩基多型 (SNP) を *rac2* 遺伝子のイントロン領域に見だし、さらにこれら SNP を含む領域が HIV-1 曝露非感染者に認められる Rac2 高発現の責任領域であることを明らかにした。またこの HIV-1 曝露非感染者に集中して認められるタイプの SNP (感染抵抗性型) を持つ健常

人とそれ以外の多型アリル (感染感受性型) を持つ健常人の PBMC を HIV-1 に感染させたところ前者の感染効率には後者に比べて著しく減少していた。これらの結果は多型に依存した Rac2 の発現制御機構がヒトに存在し、感染抵抗性型の多型アリル存在下で高発現した Rac2 が HIV-1 の感染を抑制している事を示唆している。しかし、多型依存的 Rac2 発現制御メカニズムは全くの未知であった。(2) Rac2 は Rho ファミリーに属する低分子量 G タンパク質であり、宿主自然免疫および獲得免疫の両システムに重要な働きを持つ。ファミリータンパク質である Rac1 がほぼ全ての細胞に発現する一方で、Rac2 の発現は HIV-1 感染標的細胞であるマクロファージや T 細胞などの血球系細胞に限局している。樹状細胞にも発現が認められ、その中で Rac2 は近接する T 細胞への接着と活性化のために働いている。また好中球にも発現しており細菌感染時に誘導される活性酸素の放出を担う分子装置の一部として重要な役割を担っている。さらには細胞内情報伝達分子として働きケモカイン等の発現調節に関与すると報告されている。このように Rac2 は宿主免疫システムに深く関わりを持つ分子であるが、Rac2 が持つ抗 HIV-1 活性の分子機構は全く分かっておらず、ウイルス複製の中でどの過程に抗ウイルス活性が発揮されるのかについてすら未解決のまま残されていた。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究において、多型依存的に発現する Rac2 の発現制御機構を解明する。多型依存的 Rac2 発現制御の責任領域とされている Rac2 イントロン部分の中で、その制御を担っている機能性ゲノム部位を同定し、更にその結合因子を明らかにする。また感染の際、ウイルス膜タンパク質と宿主側のウイルス受容体あるいは共受容体との結合が Rac2 の発現を誘導するのか、そうであるならばどの情報伝達系が利用されているのかを明らかにする。

(2) 本研究において、Rac2 の抗 HIV-1 活性の作用機構を明らかにする。既知の Rac2 機能から細胞骨格系の再構成を介し細胞膜の構造と機能を変化させることでウイルス粒子と宿主細胞膜の融合過程に影響している可能性が考えられる。あるいはシグナル伝達分子としての機能によりウイルス複製を阻害するサイトカインおよびケモカインの発現を増強している可能性も考えられる。これらの可能性について実験的に評価する。また、Rac2 とアミノ酸配列相同性が高い Rac1 は HIV-1 複製を支持する分子として報告されている。そこで両方で各アミノ酸残基を置換した変異体の抗ウイルス活性を評価する事で、Rac2 分子中のどのアミノ酸残基が抗ウイルス活性に必要なものであるのかを同定する。

以上で述べた目的のもと、抗 HIV-1 活性を持つ *rac2* 遺伝子とその発現制御機構から作用に至るまで解明する事は、新薬開発のための新しい標的過程の発見および合理的な免疫賦活化法の確立といった結果に繋がる事が期待される。また同時に *Rac2* が関与する宿主免疫システム全体像の理解を深めることとなる点、意義深い。

### 3. 研究の方法

(1) 多型依存的 *Rac2* 発現制御を担う機能性ゲノム部位を同定するために、ルシフェラーゼベクターを使用したレポーターアッセイを行った。ルシフェラーゼレポーターベクターはルシフェラーゼ遺伝子上流に *Rac2* プロモーター、下流に *Rac2* イントロン多型領域を持つ。組み込まれているイントロン多型領域は HIV-1 曝露非感染者に見られる感染抵抗性型の多型アリル、または HIV-1 感染者群に最も高頻度に見られる感染感受性型の多型アリルである。この異なる多型アリルを持つレポーターベクターを Jurkat 細胞に導入すると、感染抵抗性型の多型を持つベクターからはもう一方のベクターと比べてルシフェラーゼが高発現する。この結果は感染抵抗性型の多型アリルがヒトゲノム中で *Rac2* を高発現させる観察を再現している。上記レポーター中の多型領域の長さは 2.5kb であるが、その多型領域を段階的に短くした一群のレポーターを作成し、Jurkat 細胞に導入後、発現するルシフェラーゼの活性を指標として多型依存的な発現制御を担う機能性ゲノム部位を決定する。また各アリル間で認められる SNP をそれぞれ部位特異的変異導入法により変異させたレポーターを作成し、どの SNP が高発現に必要なかを明らかにする。

(2) HIV-1 感染が成立する monocyte 系の細胞株から *Rac2* に対する siRNA を恒常的に発現する細胞株も作成し、siRNA 抑制効果をウエスタンブロットにより確認する。作成した細胞と親細胞に HIV-1 を感染させ、p24 ELISA 法により各細胞からの産生ウイルス量を定量し感染効率を比較する事で、*Rac2* の抗ウイルス活性が細胞株でも再現できるか調べる。次に、樹立細胞株にウイルスを感染させ、ウイルス複製過程を追跡できる実験系を利用し、複製の阻害がどの過程で起こるのか明らかにする。既知の *Rac2* の機能から *Rac2* がケモカインやそのレセプターの発現を調節することで抗 HIV-1 活性を発揮している可能性が考えられる。そこで、樹立細胞、または感染抵抗性型および感受性型のヒト PBMC を各種刺激剤、またはウイルス粒子で刺激した時のケモカイン等の発現量について、リアルタイム RT-PCR 法、ELISA 法、および FACS 解析等により明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) 機能性ゲノム領域決定のためのルシフェラーゼレポーターアッセイにより、*Rac2* の高発現に必要な最小領域を決定した。さらにその領域内の SNP に部位特異的変異を導入した結果、高発現に最も効果を発揮する 1 塩基の同定に成功した。この塩基を含む前後十数塩基の結合モチーフを解析したところ、種々の転写因子の結合が考えられ、なかでも GATA 因子との関与が強く示唆された。

(2) *Rac2* が発揮する抗 HIV-1 活性の作用機構を分子レベルで解明するために、まず培養細胞を用いて細胞モデルを作成した。この際、HIV-1 が感染し、かつ *Rac2* の発現が認められる THP-1 細胞を使用した。THP-1 細胞に異なるターゲット領域を持つ 3 種の *Rac2* shRNA 発現ベクターをそれぞれ安定導入し、細胞株を樹立した。各々の shRNA 発現ベクターから樹立された 3 種の細胞では *Rac2* の発現が種々の程度で減少していることを確認した。その後、樹立細胞に HIV-1 を感染させると *Rac2* の発現量に依存して増殖効率が変動する事が観察された。この結果は、感染抵抗性型の *rac2* アリルを持ち *Rac2* を高発現する PBMC、または感染感受性型のアリルを持つ PBMC に HIV-1 を感染させた時、前者における感染効率が後者に比べて著しく減少する観察を再現しており、樹立した細胞が以降で細胞モデルとして使用できることが分かった。HIV-1 自身のエンベロップ遺伝子を破壊し、代わりに VSVG エンベロップタンパク質で pseudo 化した HIV-1 は、複製することはできないが、HIV-1 感染過程の 1 部を再現でき、1 回だけ感染が成立する。1 部の過程とは細胞に侵入した後の脱殻から逆転写反応を経て初期ウイルス遺伝子発現までの過程である。また、感染するとルシフェラーゼを発現するように設計されており、この系における感染効率を簡便に定量できる。VSVG-pseudo-HIV-1 を樹立細胞に感染させたところ、*Rac2* 発現の程度に関わらずルシフェラーゼの発現量に差はなかった。この結果から、*Rac2* による抗 HIV-1 活性は VSVG-pseudo-HIV-1 が再現する感染過程とは違うところで作用していることを示している。そこでその過程について調べた結果、*Rac2* は HIV-1 の受容体であり、感染に必須であるケモカインレセプター CCR5 の発現を転写レベルで抑制すること、さらに HIV-1 感染を抑制することで知られるケモカイン CCL5 の発現を増強することが分かった。これらの結果は、感染抵抗性または感受性 *rac2* アリルを持つヒト正常 PBMC を使用した実験においても追認することができた。従って、抗 HIV-1 活性の分子機構として、*Rac2* は CCR5 と CCL5 両分子の発現制御を介しウイルス-細胞間の結合効率を下げ、細胞に感染抵抗性を付与している機構が考えられる。

以上の結果は、独自に発見した HIV-1 感染抵抗因子 Rac2 の働きを分子レベルで解明した点、世界に先駆けておりインパクトが大きい。また本研究により同定された *rac2* 遺伝子制御領域に作用し、発現を増強できる低分子化合物の探索はヒトに HIV-1 感染抵抗性をもたらす可能性がある。現在、以上の結果は全て学術雑誌に論文投稿中である。

#### 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2件)

Mika Nagai-Fukataki, Takashi Ohashi, Iwao Hashimoto, Tominori Kimura, Yoshiyuki Hakata, Hisatoshi Shida (2011) Nuclear and cytoplasmic effects of human CRM1 on HIV-1 production in rat cells. *Genes to Cells* 査読有 16: 203-216.

Iñigo Narvaiza, Daniel C. Linfesty, Benjamin N. Greener, Yoshiyuki Hakata, David J. Pintel, Eric Logue, Nathaniel R. Landau, Matthew D. Weitzman. (2009) Deaminase-Independent Inhibition of Parvoviruses by the APOBEC3A Cytidine Deaminase *PLoS Pathogens* 査読有 May;5(5):e1000439.

[学会発表](計1件)

博多 義之(発表演者) Rac2 が発揮する抗HIV-1活性の分子機序, 第58回日本ウイルス学会学術集会, 2010年11月9日、徳島県あわぎんホール

[その他]

博多 義之(発表演者) HIV-1 感染抵抗因子Rac2 の下流エフェクターメカニズム, 近畿大学大学院医学研究科 ハイテクリサーチセンタープロジェクト研究報告会, 2010年3月31日、近畿大学医学部講堂ホームページ等  
<http://www.med.kindai.ac.jp/immuno/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

博多 義之(HAKATA YOSHIYUKI)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号: 30344500

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号: