

千葉工業大学
博士学位論文

レトロウイルス複製に関与する
宿主因子機能の解明とその応用

平成 26 年 3 月

阿部 真

論文目次

1. 要約	1
2. 序論	3
3. 本論	5
第1章レトロウイルス複製と宿主因子の関係.....	5
第1節 レトロウイルスについて.....	5
第2節 HTLV-1 について	6
第1項 HTLV-1 の粒子構造	6
第2項 HTLV-1 の遺伝子構造について.....	7
第3項 HTLV-1 の増殖・複製	13
第3節 HIV-1 について.....	16
第1項 HIV-1 の粒子構造.....	16
第2項 HIV-1 の遺伝子構造.....	17
第3項 HIV-1 の増殖・複製.....	22
第4節 レトロウイルス複製を制御する宿主因子.....	25
第2章HTLV-1 RexによるRNA silencing機構の制御	28
第1節 はじめに.....	28
第2節 RexによるDicerの機能阻害	29
第1項 実験方法.....	29
第2項 結果および考察.....	29
第3節 RexによるDicerの機能阻害機構の解明	32
第1項 実験方法.....	32
第2項 結果および考察.....	34
第4節 Dicerのknock-downによるウイルスタンパク質発現への影響の解析	37
第1項 実験方法.....	37
第2項 結果および考察.....	37
第5節 RexによるウイルスRNAの安定化.....	38
第1項 実験方法.....	38
第2項 結果および考察.....	38
第6節 まとめ	39
第3章ZBRK1 によるHIV-1 潜伏感染制御.....	40
第1節 はじめに.....	40
第2節 ZBRK1 によるHIV-1 LTR転写活性抑制.....	41
第1項 実験方法.....	41
第2項 結果および考察.....	42

第3節 ZBRK1 のknock-downによるHIV-1 複製の促進	45
第1項 実験方法.....	45
第2項 結果および考察.....	46
第4節 ZBRK1 のLTR結合領域の同定	49
第1項 実験方法.....	49
第2項 結果および考察.....	49
第5節 ZBRK1 によるLTR転写抑制機構の解明	53
第1項 実験方法.....	53
第2項 結果および考察.....	53
第6節 まとめ	57
第4章PGA1 を用いたAPOBEC3G依存的なHIV-1 複製の制御	58
第1節 はじめに.....	58
第2節 PGA1 によるHsp70 誘導はAPOBEC3G依存的にHIV-1 感染性を抑制	59
第1項 実験方法.....	59
第2項 結果および考察.....	59
第3節 PGA1 を用いた内在性APOBEC3G依存的なHIV-1 複製抑制	62
第1項 実験方法.....	62
第2項 結果および考察.....	62
第4節 まとめ	65
4. 実験	66
4.1. 試薬および器具.....	66
4.2. 試薬調製.....	68
4.3. 実験方法.....	71
5. 総括	74
6. 参考文献	77
7. 博士後期課程における業績	91
8. 謝辞	93

1. 要約

本論文は「レトロウイルス複製に関与する宿主因子機能の解明とその応用」と題し、4章20節より構成される。

本論文第1章では、レトロウイルスと宿主因子の関係について記述した。ヒトに感染するレトロウイルスとして HTLV および HIV が知られており、HIV に対する治療では抗 HIV 薬を組み合わせた治療法 (anti-retrovirus therapy; ART) が顕著な効果を上げているが、HTLV に対する治療法は現在のところ確立されていない。レトロウイルスの発見後、精力的な研究によりウイルス複製に不可欠な宿主因子が次々と見出された。最近では、ウイルス複製に対し負に制御する宿主因子 (TRIM5a, APOBEC3 family, SAMHD1, Tetherin/BST-2) の存在も明らかにされてきており、既存のレトロウイルス治療に対する諸問題を克服する鍵として、ウイルス複製に係わる宿主因子の研究が注目されている。レトロウイルスは、宿主因子を利用することで複製を有利にし、一方で複製を阻害する宿主因子に拮抗するための機能を備えている。新規レトロウイルス治療薬の開発を考える上で、これらは非常に有意義な標的となりうる。そこで本研究では、レトロウイルス複製に関与する新たな宿主因子を探索し、これらの機能を解明するとともに、その知見を基に新たなレトロウイルス治療薬の研究開発につなげることを目的とした。

本論文第2章では HTLV-1 Rex による RNA silencing の抑制について検討した。宿主の持つ RNA silencing 機構は、短鎖 RNA (siRNA や miRNA) が遺伝子の発現を制御する機構である。近年、RNA silencing 機構とレトロウイルス複製の関係は精力的に研究され、これまでに HIV-1 にコードされる miRNA や宿主にコードされる HIV-1 を標的とした miRNA の存在が報告されており、HTLV-1 では ATL の発症と miRNA の関連も注目されている。また、HIV-1 は宿主の持つ RNA silencing 機構から逃避するため RNA silencing suppressor (RSS) タンパク質 Tat をコードしていることが報告されている。そこで、HTLV-1 にコードされる Rex が RNA silencing 機構を制御する機能を有するかについて検討した。その結果、Rex は短鎖 RNA の成熟に関わる Dicer と相互作用することで Dicer の機能を阻害し、RNA silencing 機構から逃避してウイルス複製に有利に働くことをはじめて明らかにした。

本論文第3章では ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染制御について検討した。HIV-1 の転写活性には様々な宿主転写因子が関わっていることが明らかにされており、HIV-1 潜伏感染の維持には転写抑制因子によるヒストンの脱アセチル化が重要である。HIV-1 は潜伏感染することで感染細胞を宿主免疫および HIV-1 治療薬から逃避する。そこで、様々な遺伝子の転写制御に関わる宿主因子 KRAB-Zinc finger タンパク質の一種である ZBRK1 に着目し、HIV-1 潜伏感染を制御するかを検討した。その結果、ZBRK1 は HIV-1 LTR に結合して Trim28 と相互作用し、HDAC2 によるヒストンの脱アセチル化を誘導することで HIV-1 潜伏感染を制御することを明らかにした。

本論文第4章では PGA1 による APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製制御について検討した。

APOBEC3G は HIV-1 複製を負に制御する宿主因子であり、HIV-1 粒子に取り込まれることで HIV-1 複製を強力に抑制する。しかし、HIV-1 は APOBEC3G を分解する Vif をコードしている。我々は、これまでに Hsp70 が Vif と APOBEC3G の結合を阻害することで Vif による APOBEC3G 分解を抑制し、さらに HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みを促進することを報告した。そこで、Hsp70 発現を誘導する低分子化合物が新たな HIV-1 治療薬の開発につながるのではないかと仮説の基、探索を行った。その結果、Prostaglandin A1 (PGA1) は Hsp70 発現を誘導し、Vif による APOBEC3G 分解を抑制するとともに HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みを促進することで HIV-1 複製を負に制御することを明らかにした。これらの結果より、抗 HIV-1 活性を有する APOBEC3G の機能を発揮させるために必須な宿主因子 Hsp70 を発現誘導する PGA1 は新規 HIV-1 治療薬として期待される。

以上、HTLV-1 Rex による RNA silencing 機構の制御、ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染制御といった新たな宿主因子とレトロウイルス複製の相互作用分子メカニズムを明らかにした。また、HIV-1 Vif による APOBEC3G の分解を制御する宿主因子 Hsp70 を発現誘導する低分子化合物 Prostaglandin A1 (PGA1) を見出した。これらの知見より、レトロウイルス複製と宿主因子の相互関係を明らかにすることは新たなレトロウイルス治療薬の開発につながると期待される。

2. 序論

レトロウイルス (retrovirus) とは, RNA ウイルス類の中で逆転写酵素を持つウイルスの総称であり, ヒトに感染するレトロウイルスとして, ヒト T 細胞白血病ウイルス (Human T-lymphotropic virus; HTLV) とヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus; HIV) が知られている.

HTLVは世界で初めて発見されたヒトに感染するレトロウイルスである. 1977年, 京都大学医学部の高月博士のグループが, 日本の南西部に多発するT細胞性の白血病が新しいタイプの病気であることを発見し, 成人T細胞白血病 (Adult T-cell leukemia; ATL) と命名し報告された^[1]. 1979年に岡山大学の三好博士がATL患者から確立した細胞株MT-1^[2]を用い, 1981年に京都大学ウイルス研究所の日沼博士のグループによりATL患者抹消血液から成人T細胞白血病ウイルス (Adult T-cell leukemia virus; ATLTV) が単離された^[3]. 一方, アメリカでは1980年に米国国立癌研究所のGalloらが菌状息肉腫の患者からレトロウイルスを分離し^[4], その後1982年にヘアリー細胞白血病の患者から別のレトロウイルスを分離し^[5], それぞれHuman T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) およびtype 2 (HTLV-2) と命名した. その後, 癌研究所の吉田博士のグループによりこれらのウイルスの全遺伝子構造が解析され, ATLTVとHTLV-1が同一のウイルスであることが明らかとなり^[6,7], 現在ではヒトT細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) と総称される.

HTLV発見から1年後の1981年, アメリカのロサンゼルスで男性同性愛者の日和見感染症として後天性免疫不全症候群 (Acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) は初めて発見された^[8]. AIDSの病原体は, 1983年にフランスのパスツール研究所のMontagnierらによりリンパ節腫脹症候群の患者から非腫瘍性レトロウイルス (後にLymphadenopathy associated virus; LAV-1と命名) を分離, 同定し報告された^[9]. その翌年の1984年には米国国立癌研究所のGalloらにより患者やハイリスクグループの人々から, レトロウイルス (Human T-lymphotropic virus-III; HTLV-III) が分離された^[10]. 1985年, HTLV-IIIとLAV-1の構造が相次いで明らかにされ, LAV-1とHTLV-III_B (HTLV-IIIの株の一つ) が同一のウイルスであることが判明し^[11], 両者の名称は後にHIV type 1 (HIV-1) に統一された. また, 1986年にMontagnierらは西アフリカのAIDS患者よりHIV-1と異なるAIDS病原ウイルスを分離し^[12], これをHIV type 2 (HIV-2) と呼ぶようになった.

HTLV-1およびHIV-1の主な感染経路としては母乳を介した母子間垂直感染と輸血, 薬物乱用, 性交渉による水平感染が挙げられ, 宿主細胞はCD4陽性T細胞を中心とした免疫担当細胞である. HTLV-1は, これらの細胞に潜伏感染し, 生体内においてウイルスの複製よりも感染細胞のクローナルな増殖により, そのコピー数を維持する^[13]. HTLV-1感染者のうち, 約5%が50-60年という潜伏期間を経て白血球がガン化してATLを発症し, 平均1年程度で死亡する. HTLV-1感染者は全世界に1-2千万人存在し, 日本南西部, カリブ海沿岸地域, アフリカ中央部, 南アメリカ, ソロモン諸島などの限られた地域に感染者が集中しており, 日

本国内では108-120万人と推定されている。一方、HIV-1は感染細胞内で活発にウイルス複製し、膨大なウイルス粒子を産生する。HIV-1感染者は、一般的に10年という潜伏期間を経て白血球を破壊して免疫機能を低下させ、AIDSを発症する。国際連合エイズ合同計画 (Joint United Nations Programme on HIV and AIDS; UNAIDS) の最新の報告によると2012年のHIV-1感染者の世界総数は、3,530万人 [3,220-3,880万人] に達しており、日本国内では2万人に達している。

レトロウイルスのゲノムは感染細胞の染色体に組み込まれるため、体内からウイルスを完全に排除することは不可能である。HTLV-1の潜伏期間は非常に長いため、生涯にわたってATLを発症する可能性は低い。したがって、感染者に対する治療は行わず、ATLを発症してから治療を行うが有効な治療法は未だ確立されていない。また、HIV-1感染者に対する治療としてウイルスの持つ逆転写酵素、ウイルスプロテアーゼおよびインテグラーゼに対する阻害剤、さらにウイルスの侵入を阻止するエントリー阻害剤のうち複数を同時に用いる多剤併用療法 (highly active anti-retrovirus therapy; HAART) によりAIDS発症までの期間を顕著に遅らせることが可能である。現在では単にART (anti-retrovirus therapy) と呼ばれる。しかし、多剤耐性ウイルスの出現や重篤な副作用といった問題点も抱えているため、新規の治療薬の開発が期待されている。

ウイルスが引き起こす感染症に対する既存の薬剤は、ウイルス側の因子を標的としたものが主流であり、薬剤耐性ウイルスの出現が極めて重大な問題となっている。これまでに基礎科学の立場から多様なウイルスの複製に不可欠な宿主因子が次々と見出され、さらに最近では、ウイルス複製に対して負に制御する宿主因子の存在も明らかにされつつあり、既存薬剤に対する諸問題を克服する鍵として、ウイルス複製に関する研究が注目されている。レトロウイルスは、宿主因子を利用することで複製を有利にし、一方で複製を阻害する宿主因子に拮抗するための機能を備えている。

そこで本研究では、レトロウイルス複製に関与する新たな宿主因子を探索し、これらの機能を解明するとともに、その知見を基に新たなレトロウイルス治療薬の研究開発につなげることを目的とした。

3. 本論

第1章 レトロウイルス複製と宿主因子の関係

第1節 レトロウイルスについて

レトロウイルスとは逆転写酵素を持つRNAウイルス (reverse transcriptase containing RNA virus) を意味している。逆転写酵素とはRNAからDNAへと逆に転写する酵素で、1970年にニワトリのラウス肉腫ウイルスとマウスのラウシャー白血病ウイルスから発見された^[14,15]。

レトロウイルスは病原性によって大きく3種類に分類されている。腫瘍をつくるオンコウイルス、長い潜伏期間を経て神経系、造血系を侵すレンチウイルス、病原性は不明であるが *in vitro* で細胞に泡状の細胞障害を起こすスプーマウイルスの3種類である。

オンコウイルスの中にはウイルス癌遺伝子 (viral oncogene; *v-onc*) を持つウイルスと、持たないウイルスがある。持たないウイルスはウイルス血症を経て感染細胞内の癌遺伝子 (cellular oncogene; *c-onc*) の近傍にウイルス遺伝子が組込まれた結果、発癌に至る。*v-onc* は本来 *c-onc* に由来しており、活性化された癌遺伝子となってレトロウイルスをベクターとして伝播している間にウイルスそのものの遺伝子になったものである。ATLの病原体であるHTLVはオンコウイルスに分類される。

レンチウイルスはヒツジに中枢神経麻痺を起こさせるビスナウイルスが最初に発見された。感染後数年以上の長い潜伏期間を経て発症する。ヤギやヒツジの気管支や肺胞を侵す肺疾患の病原体であるマエディウイルス、脳炎、関節炎を起こす caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV)、ウマに貧血を起こす伝染性貧血ウイルス (equine infectious anemia virus; EIAV) などのレンチウイルスは古くから獣医学の分野で知られていた。1980年代に入ってから免疫不全症 AIDS の病原体であるヒトの HIV、サルの免疫不全ウイルス (simian immunodeficiency virus; SIV)、ネコの免疫不全ウイルス (feline immunodeficiency virus; FIV) などがこのグループに新しく加わった。

いまだに病原性の不明なスプーマウイルスは、ヒト、サル、ネコで見つかっており、それぞれヒト泡沫ウイルス (human foamy virus)、サル泡沫ウイルス (simian foamy virus)、ネコ泡沫ウイルス (feline foamy virus) と呼ばれている。

第2節 HTLV-1 について

第1項 HTLV-1 の粒子構造

HTLV-1 は、二本のプラス鎖 RNA をゲノムとして持つ、直径約 100 nm の球体ウイルスである (図 1-1). ゲノム RNA には Gag p15 が直接結合して保護している、その周りに Gag p24 が正十二面体結晶性構造のキャプシドを形成する。キャプシド内にはウイルスプロテアーゼ PR、逆転写酵素と RNase H 活性を持つ 2 種類のタンパク質サブユニット RT (p62/p32)、インテグラーゼ IN などのウイルス酵素が含まれている。さらに、キャプシドは Gag p19 によって取り囲まれ、ウイルス表面の脂質二重膜には Env gp21・gp46 がスパイク構造を形成している。

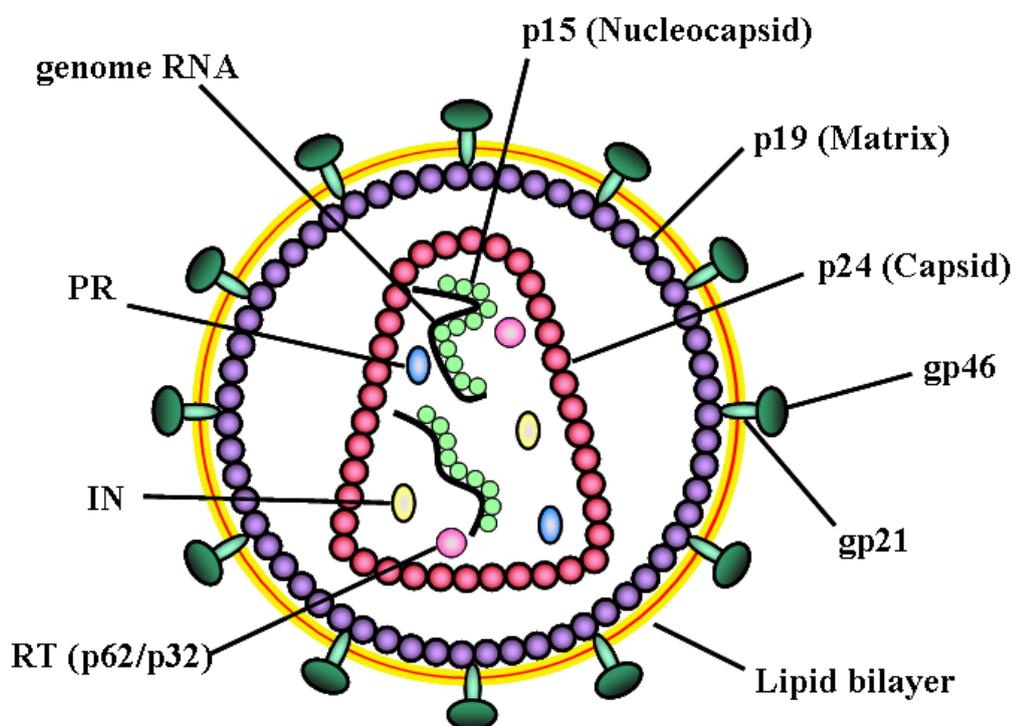


図 1-1 HTLV-1 の粒子構造

第2項 HTLV-1 の遺伝子構造について

HTLV-1 のプロウイルスは、約 9 kb で両端に Long terminal repeat (LTR) を持ち、3 種類の構造タンパク質をコードする遺伝子 (*gag*, *pol*, *env*) を有している (図 1-2). HTLV-1 に特徴的な配列として *env* と 3'LTR の間に pX 領域が存在する. pX 領域のプラス鎖には 4 種の Open reading frame (ORF) と alternative splicing により複数の調節遺伝子が存在する. ORF I には *p12*, ORF II には *p13* と *p30*, ORF III には *rex* と *tax*, ORF IV には *tax* がコードされている^[16]. また, pX 領域のマイナス鎖には HTLV-1 bZIP factor (HBZ) がコードされており, spliced form と unspliced form が報告されている^[17,18]. これらの調節遺伝子はウイルスおよび宿主遺伝子の発現および機能の調節を行う. それぞれの遺伝子にコードされている構造タンパク質および調節タンパク質の機能を以下に示す.

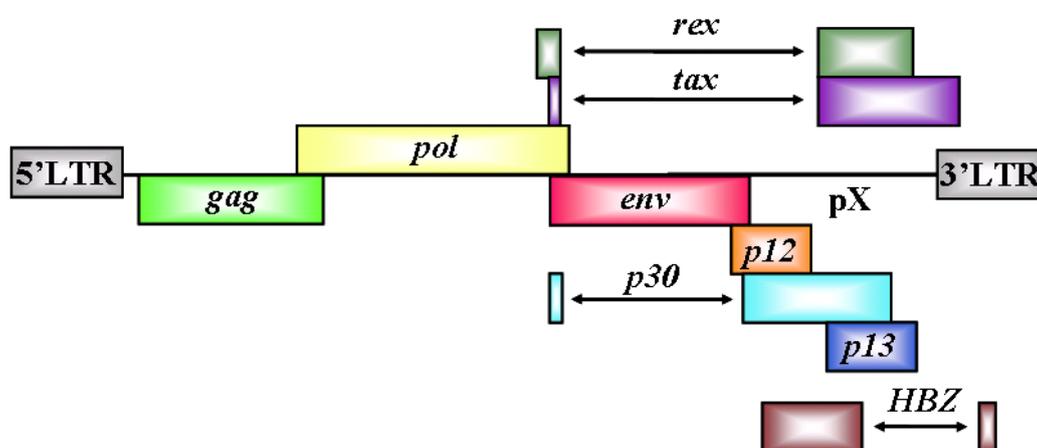


図 1-2 HTLV-1 の遺伝子構造

1) LTR

LTRはU3-R-U5 から構成され、プロモーターおよび転写終結配列が含まれる. その転写活性はLTR内部の特異的なDNA配列と結合する種々の転写因子に依存する. HTLV-1 のエンハンサーはU3 領域内のTax responsive element 1 (TRE1) と呼ばれる 21 bpの反復配列からなり, GCリッチな配列に挟まれたcyclic AMP response element (CRE) のコア配列を持つ^[19,20] (図 1-3). CREには細胞性のbZip転写因子であるCREBおよびATF-1 が結合する. さらに, TRE2 にはSRF (serum response factor) およびTCF (ternary complex factor) 結合配列が含まれる^[21]. その他にHTLV-1 の転写活性に関わる転写因子としてMyb, Ets1, AP-2, Sp-1, TIF-1 が報告されている^[22].

ることにより細胞質内Ca濃度を上昇させ、nuclear factor of activated T cells (NFAT)の活性化を介してT細胞の活性化を誘導する^[16,27]。一方、p12はMHC class I heavy chainsと結合しプロテアソームにおける分解を促進する^[28]。これらの所見からp12は感染細胞の増殖を促進するのみならず、抗原提示能を抑制することにより宿主免疫から回避すると考えられる。

6) p30

p30はORFIIにコードされ、CREB binding protein (CBP) /p300と相互作用することによりTaxと競合して転写活性化を抑制することが知られていた^[29]。その後、p30は核に局在しtax/rex mRNAと結合することにより細胞質への輸送を阻害することが報告された^[30]。その結果、TaxおよびRexの発現量は減少しウイルスの転写活性化も抑制され、ウイルスの潜伏感染に関与すると考えられる。また、p30はc-Myc、60 kDa Tat-interacting protein 双方との相互作用を介してCyclin D2の活性化およびS期への進行を促進し、c-Mycによるトランスフォーミング能を増強するとの報告もある^[31]。さらに最近、p30が不適切なDNA修復を活性化させ、感染細胞をトランスフォームする間にDNA傷害の蓄積を引き起こすことが示された^[32]。

7) p13

p13はORF IIにコードされ、ミトコンドリアに局在し、Rasをファルネシル化する酵素であるfarnesyl pyrophosphate synthetaseと結合してRas依存性のアポトーシスに対する感受性を亢進することが知られている^[33,34]。

8) tax

Taxは、HTLV-1感染細胞の不死化に中心的に作用するウイルス由来のoncoproteinとして最も詳細に解析されている。Taxの機能はNF-κ B, SRF, CREBといった宿主転写因子の活性化による宿主遺伝子転写の活性化、lck, p18, DNA polymerase β遺伝子などの転写抑制、および宿主因子との相互作用による機能抑制 (p53, MAD1, RanBP1, TAX1BP2) などが挙げられる^[35-38]。これらの作用によりTax発現細胞は増殖能亢進、アポトーシス抵抗性を獲得し、加えてTaxは細胞周期チェックポイントの破綻と染色体不安定性に寄与すると考えられる。個体におけるTaxの機能はTaxトランスジェニックマウスを用いて複数の研究室により解析されているが、白血病を発症する系統から、間葉性腫瘍、神経線維腫瘍および外分泌腺炎、関節炎、皮膚病変を発症する系統など報告により表現型は様々である^[39-46]。その中でLckプロモーター制御下にTaxを発現するマウスでは、CD4陰性CD8陰性のpre-T細胞性のリンパ腫および白血病を発症し、核にくびれを有する腫瘍細胞の出現、日和見感染の合併、腫瘍細胞における恒常的NF-κ Bの活性化などATLに類似した表現型を示す^[42]。しかし、ATL患者の腫瘍細胞では多くの症例においてTaxの発現は不活化

されていることが明らかとなってきた^[47].その機序は*tax*遺伝子の変異, *tax*のプロモーターである 5'LTRの欠失, 5'LTRのメチル化などが挙げられる^[47-50]. Taxは細胞傷害性Tリンパ球 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の認識する主要なウイルス抗原であり^[51], Tax発現細胞はCTLにより排除される. これらの知見は, がん化の最終段階ではTaxは不要であり, 不活化された方が宿主免疫からの逃避に有利であることを示唆している.

9) *rex*

ORF III はalternative splicingにより 2 種類のタンパク質, Rex (p27Rex) と p21Rexをコードする. Rexは, N末端からRNA binding domain (RBD) /nuclear localization signal (NLS) , nuclear export signal (NES), NESを挟むように 2 つのmultimerization domain, C末端に stability domain を持つ (図 1-4). HTLV-1 のmRNAは転写後修飾により unspliced, singly-spliced, doubly-spliced の 3 種類のmRNAとなる. Rexは 5'LTRから転写されるmRNA群の 3'側に位置するRex-responsive element (RxRE) への結合を介してウイルスのゲノムRNAおよび構造タンパク質をコードするmRNA (unspliced, singly-spliced) の核から細胞質への輸送を促進し, 一方で*tax/rex* mRNA (doubly-spliced) の輸送を抑制する^[16,52]. RxREは 3'LTRのU3 からR領域にかけての 255 ntに位置し, 安定な4つのstem-loop構造をとり^[54], Rexの結合部位が3箇所明らかとなっている^[53-57] (図 1-5). また, RxREはRexの結合だけでなくpolyAシグナルという重要な目印となる^[58]. RexによるウイルスRNAの核外輸送には, 宿主因子Exportin-1 (CRM1) との結合が関与しており, CRM1 依存的に核外へと輸送される^[59]. これらの所見よりRexはウイルスの産生を促進するが, Taxの発現を抑制する作用を有すると言える. p21Rexはp27RexのRBD/NLSを含むN末端 78 残基を欠損しており, 現時点でその機能は不明であるがp27Rexのドミナントネガティブとして機能しているのではないかと考えられる.

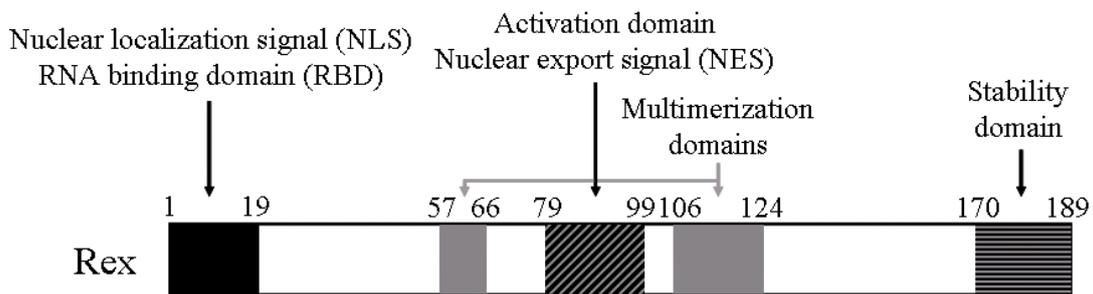


図 1-4 Rex の構造

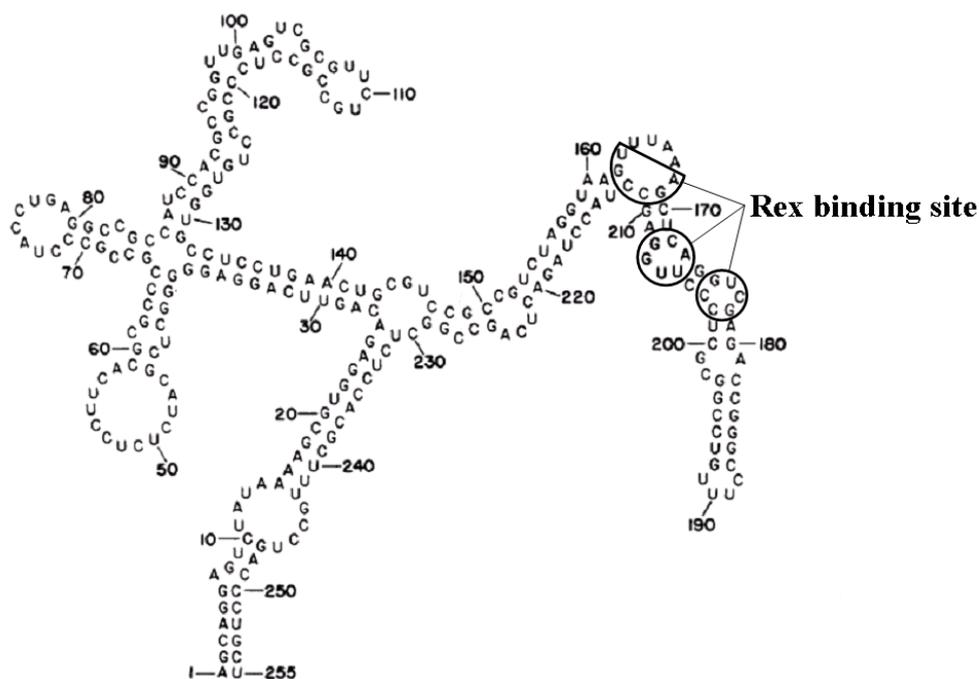


図 1-5 RxE の構造および Rex 結合部位

10) HBZ

HTLV-1 マイナス鎖はHBZ遺伝子をコードしている。この遺伝子は以前よりその存在は知られていたが、2002年にCREB-2との結合を介してTaxのウイルス転写活性を抑制することが報告された^[17]。ATL細胞におけるHTLV-1プロウイルスの解析から、5'LTRはしばしば欠損したりDNAメチル化されたりしているのに対し、3'LTRは欠損することもDNAメチル化されることもないことが分かっていた^[47-50]。このことから、マイナス鎖にコードされているHBZが3'LTRをプロモーターとしてATL細胞でも発現し、ATL発症や腫瘍性増殖の維持に重要な働きをしていることが考えられている。また、HBZはC末端側にbZIP領域を持つタンパク質であり、c-Jun, JunB, JunDなどのAP-1宿主転写因子と結合する。c-Jun, JunBに関してはその活性を抑制し^[60,61]、JunDに関しては逆にその活性を上昇させることがこれまでに報告されている^[62]。ウイルスに対する作用としては、Taxによる5'LTRからのウイルス遺伝子発現を抑制する働きを持っている。さらにHBZはウイルスの転写に対する作用だけでなく、感染細胞の増殖においても重要な役割を果たしている事が分かっている。ウサギを用いたウイルス感染実験で、HBZ遺伝子を欠損したウイルスは野生株のウイルスに比べ、生体内でのウイルス増殖効率が低い事が報告されている^[63]。また、マカクザルに対するウイルス感染実験でHBZの変異ウイルスは感染後数週間で野生株に置換されたという結果も、HBZが生体内でのウイルスの増殖に極めて重要な働きをしているということを示唆している^[64]。HBZが感染細胞の生存や増殖を促す作用機序として、HBZにより5'LTRからの転写が抑制されウイルス抗原の発現が制御されること

により、感染細胞を宿主免疫から逃避させる可能性が考えられる。もう一つの可能性として、HBZが持つT細胞増殖作用により、直接感染細胞を増加させている事が示唆されている^[65]。

第3項 HTLV-1 の増殖・複製

HTLV-1の感染は、大部分が感染細胞と非感染細胞の細胞間接触 (cell-to-cell感染) により成立し、遊離ウイルス粒子を介する感染は非常に効率が悪い^[66,67]。そのため、新規感染を起こすには体内への生きた感染細胞の侵入が必要である。このようなウイルス粒子をほとんど作らない増殖様式は、宿主免疫機構から逃避するのに非常に都合が良く、50-60年という長い潜伏感染を可能にしていると考えられる。HTLV-1は一度感染が成立すると、感染細胞自身を増殖させることでウイルスのコピー数を増加させていく^[13]。その結果、一部の感染細胞が癌化してしまい、ATLという白血病を引き起こすと考えられている。

HTLV-1の細胞間伝播の際、ウイルス感染細胞 (ドナー細胞) と非感染細胞 (レシピエント細胞) の細胞間には神経細胞にみられるシナプスと呼ばれる極性構造が形成される^[68]。このシナプスは、細胞骨格分子であるアクチンにより裏打ちされ、ウイルス構造蛋白質であるGagやEnvが非感染細胞の近接面に向かって集積すること、免疫反応において抗原提示細胞とその抗原の反応性T細胞との間に形成される免疫シナプスと類似することより、ウイルスシナプスと命名された。しかし、免疫シナプスとウイルスシナプスには大きく異なる点がある。アクチン重合により細胞内に形成される微小管形成中心 (microtubule organizing center ; MTOC) が、免疫シナプスの場合はシナプスのレシピエントである反応性T細胞内に形成され、T細胞受容体であるTCR分子を中心にその下流シグナル伝達分子群の集合が観察されるが^[69]、ウイルスシナプスの場合は、レシピエントでなくドナー細胞すなわち、感染細胞側にMTOCが形成されることである。また、通常はT細胞にはみられないICAM-1がHTLV-1感染により発現誘導され^[70]、ICAM-1のリガンドであるレシピエントT細胞上のLFA-1と会合することにより誘導される感染細胞のMTOC形成が、ウイルスシナプスの開始メカニズムであることがわかってきた。さらに、共焦点顕微鏡と電子顕微鏡データの3次元解析でウイルス粒子レベルまで可視化することにより、ウイルスは細胞外に放出され、ドナーとレシピエント細胞間の間隙に停留していることが明らかとなった^[71,72]。ウイルス粒子の周囲には炭水化物が豊富で、コラーゲンやアグリンなどのポリサッカライドで覆われた構造体が形成されており、これらの構造体を機械的に壊すとウイルス感染性は顕著に低下する。そして、この構造体は細菌が生体内で感染性を維持するために形成するバイオフィルムに非常に酷似していることから、HTLV-1の細胞間伝播に重要な役割を果たしていることが明らかにされた^[72]。

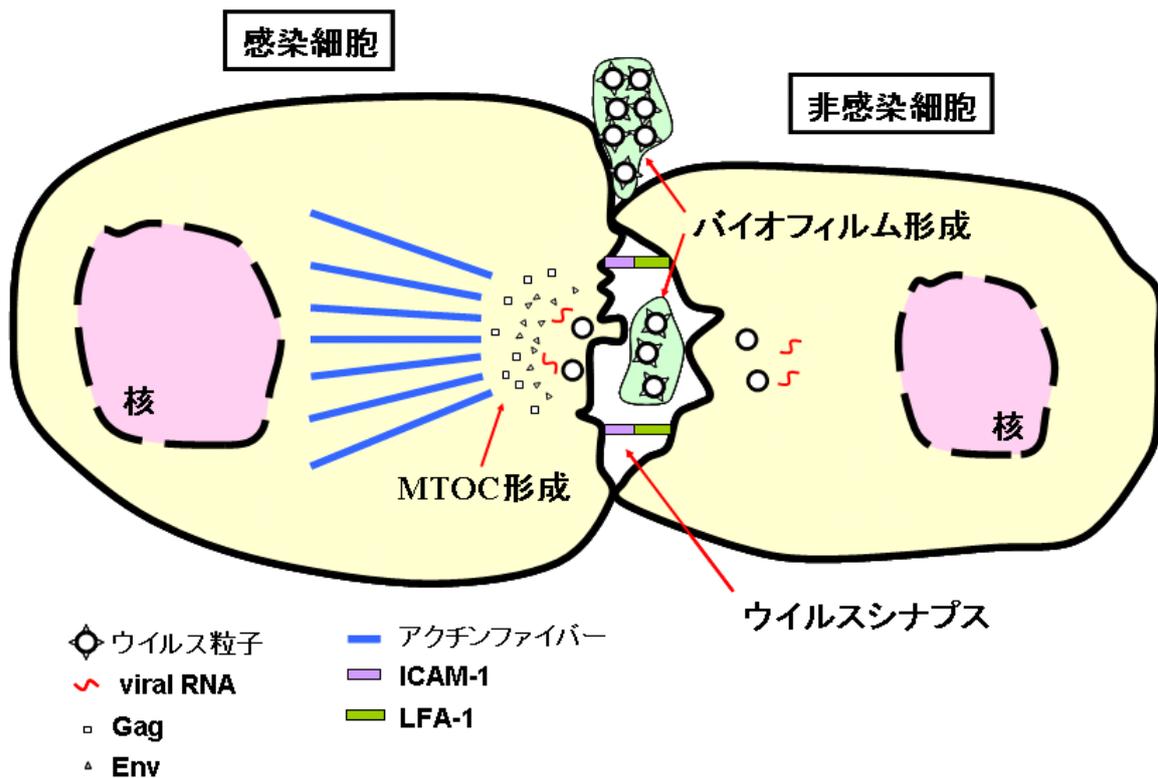


図 1-6 HTLV-1の細胞間ウイルス伝播

HTLV-1はT細胞のみならず、樹状細胞 (Dendritic cell; DC), B細胞, 単球など様々な細胞に感染することが知られている^[73,74]. このことから, HTLV-1のレセプターは細胞表面に広範に発現する分子であると考えられていたが, 2003年にglucose transporterのGLUT-1であることが報告された^[75]. さらに, 2005年にheparan sulfate proteoglycan (HSPG), 2006年にneuropilin-1 (NRP-1) がHTLV-1の感染に重要な役割を果たしていることが報告された^[76,77]. 現在では, HTLV-1の感染にはGLUT-1, HSPG, NRP-1の3種類がレセプターとして機能すると考えられている^[78]. まず, gp46 (SU) がHSPGと結合してHTLV-1は細胞表面に吸着し, SU/HSPG複合体がNRP-1をリクルートすることでSU/HSPG/NRP-1複合体を形成する. SUとNRP-1の直接の結合により, SUは構造変換を引き起こし, GLUT-1との結合が可能となる. さらに, SUとGLUT-1の結合が引き金となり, TMのフュージョンペプチドが暴露される (図 1-7).

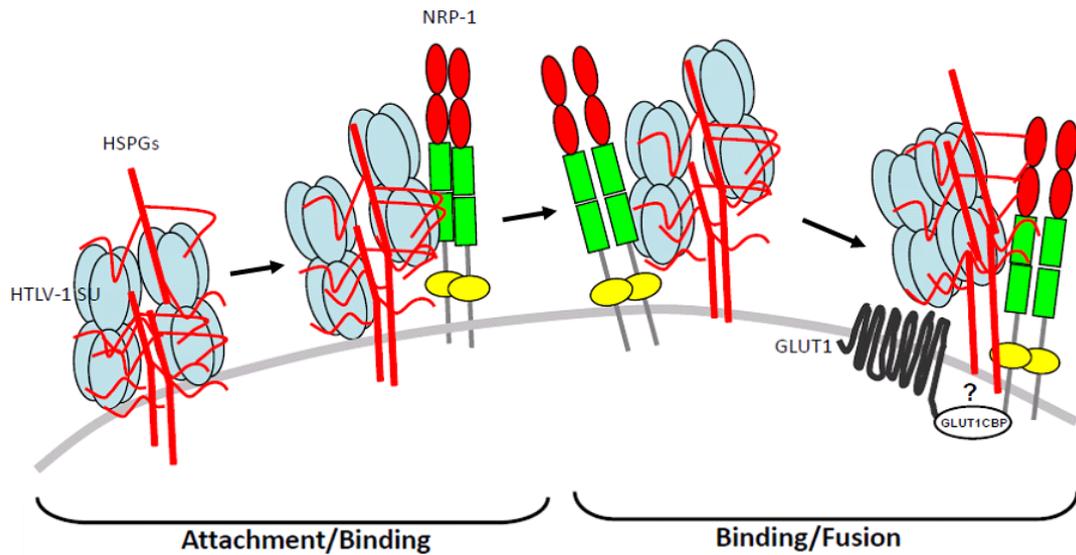


図 1-7 HTLV-1 のレセプター複合体形成モデル

HTLV-1 複製において HTLV-1 遺伝子の発現には、調節タンパク質である Tax および Rex が重要な役割を果たしている。感染初期には、double spliced mRNA から Tax および Rex が発現する。Tax は、核内に移行してプロモーターである LTR に結合し、LTR からの転写を活性化する。Rex は、核内に移行して double spliced mRNA の核外輸送を抑制し、single spliced mRNA と unspliced mRNA を核外に輸送する。その結果、ウイルス構造タンパク質が合成され、ウイルス粒子が形成される (図 1-8)。

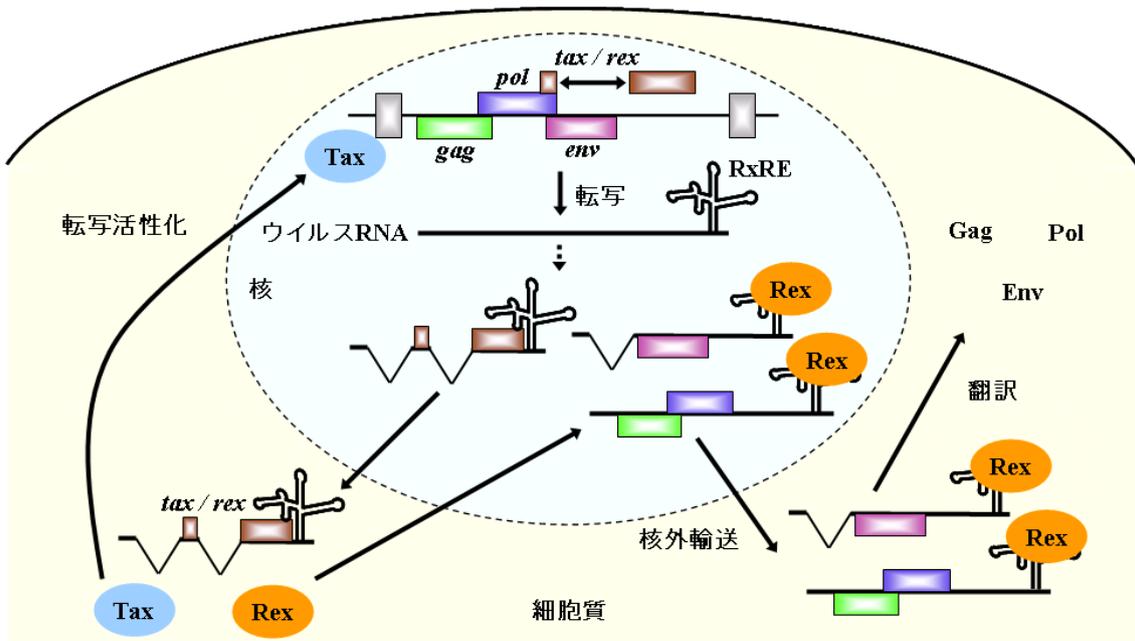


図 1-8 HTLV-1 複製における Tax・Rex の機能

第3節 HIV-1 について

第1項 HIV-1 の粒子構造

固定、染色されたHIV-1 は直径が約 100 nmの球状の粒子で内部の電子密度が高く、ウイルスコアを形成している^[79]。コアは2本の+鎖ウイルスゲノムRNAと逆転写酵素、Gagタンパク質で構成されている。Gagタンパク質前駆体 (Pr55) はウイルスプロテアーゼでプロセッシングされて、MatrixMA (p17) とキャプシドタンパク質 (p24) とヌクレオキャプシドタンパク質NC (p7) で構成された正 12 面体の結晶様の構造をもつようになる。これをコアまたは核様体とも呼んでいるが、その内部にはウイルスタンパク質複合体をプロセッシングするウイルスプロテアーゼPR (p10)、逆転写酵素とRNase H活性をもつ2種類のタンパク質サブユニットRT (p66, p51)、それに宿主ゲノムへの組込みに関与するインテグラーゼIN (p31) などのウイルス酵素群が含まれている (図 1-9)。核様体を取り囲むウイルス表面の脂質二重膜 (envelope) にはEnvと呼ばれる糖タンパク質 (glycoprotein) がスパイク構造を形成しており、Env前駆体 (gp160) は、宿主細胞のプロテアーゼによってgp120 とgp41 にプロセッシングされて、粒子表面を構成している。gp120 は宿主細胞膜にあるウイルスレセプターと結合する部位をもち、gp41 は膜貫通タンパク質であり、ウイルス表面膜を貫通しており、感染したウイルスが細胞に侵入する際にも細胞膜を貫通して核様体を細胞質内に導入する役目を果たしている。

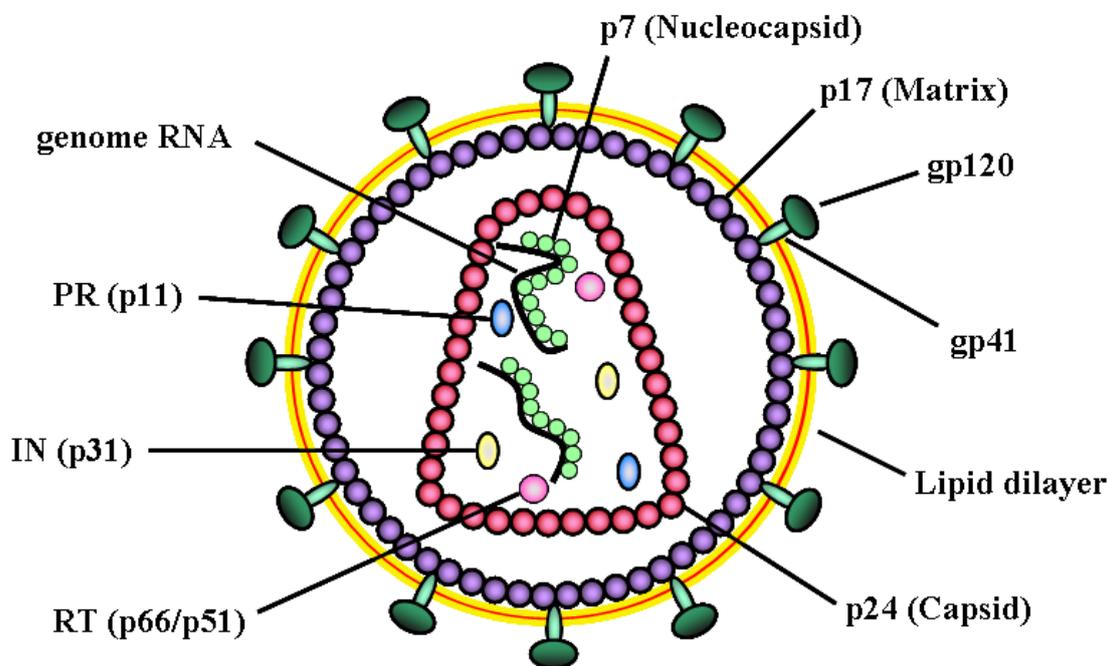


図 1-9 HIV-1 の粒子構造

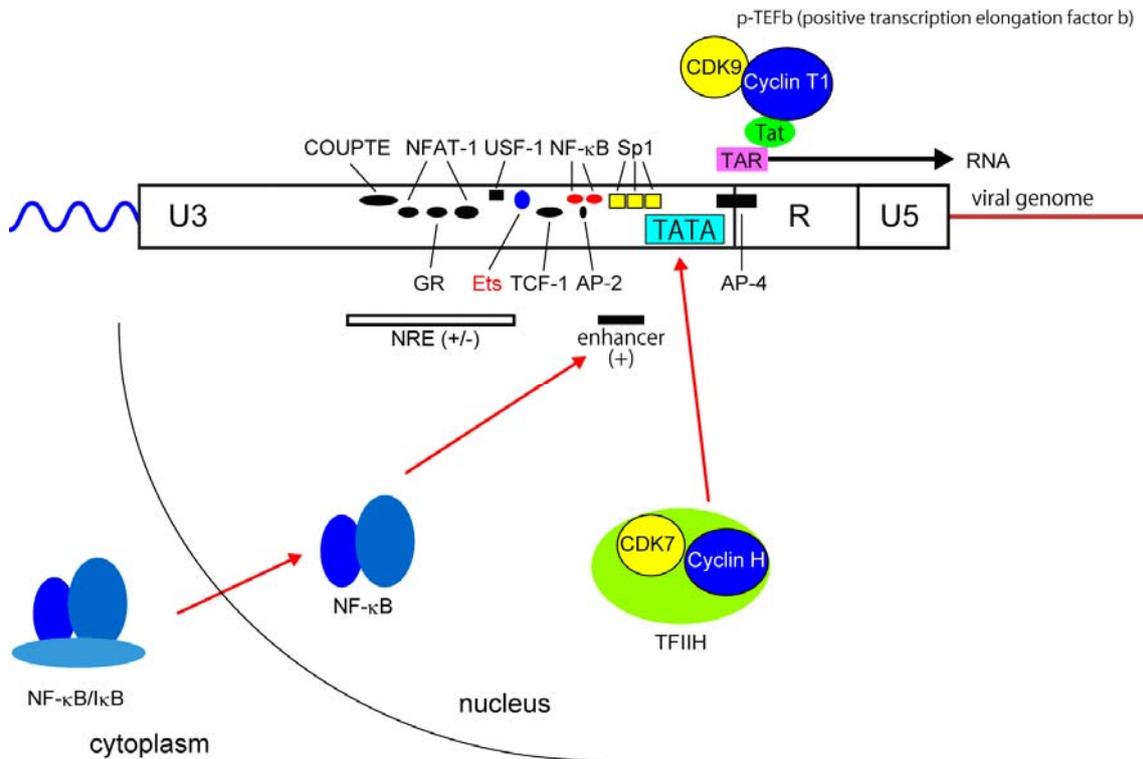


図 1-11 HIV-1 LTR の構造と転写活性化因子

2) *gag*

*gag*は、Gagタンパク質をコードしており、GagはMatrix (MA/p17) –Capsid (CA/p24) –p2-Nucleocapsid (NC/p7) –p1-p6 の順で4つのドメインがつながったポリペプチドの状態
で細胞膜上に局在しており、ウイルス粒子出芽後にウイルスプロテアーゼによりプロセ
ッシングされる。p2 とp1 は短いスペーサーペプチドであり、MAは球状の構造で細胞膜
と面する領域にはミリスチル基と塩基性アミノ酸が集中する。ミリスチル基は原形
質膜 (plasma membrane; PM) との疎水結合を、塩基性アミノ酸群はPMとの電氣的結合を
与えている。CAは構造的にN末端側とC末端側に分けられる。N末端側は6量体を形成し、
C末端側は2量体を形成する。6量体ユニット同士の間で2量体が形成されるため、CA
はフラレン構造となる。NCは2つのジンクフィンガードメインをもち、ジンクフィン
ガードメインとゲノムRNAが結合し、ゲノムRNAはHIV-1 ウイルス粒子内にパッケージ
ングされる。p6 は液胞に局在化しているタンパク質Tsg101 およびAIP1/ALIXと相互作用
することによりPMからのHIV粒子出芽の中心的な役割を担っている^[83-89]。

3) *pol*

*pol*はウイルス酵素群をコードしており、*gag*と同様にポリペプチドの状態で発現し、ウ
イルスプロテアーゼにより、逆転写酵素 (RT), RNA分解酵素 (RNase H), ウイルスDNA

を宿主細胞のゲノムDNAに組込むインテグラーゼ (IN) となる。また、*pol*は開始コドンを持たないため、*gag*のmRNA内のUUUUUUAから-1 リボソームフレームシフトすることにより、タンパク質が翻訳される^[90,91]。

4) *env*

*env*はレトロウイルスの皮膜タンパク質であるgp120 (SU) とgp41 (TM) の前駆体タンパク質であるgp160 をコードしている。このgp160 は宿主由来のプロテアーゼによりプロセッシングされ、gp120 とgp41 になる。gp120 はHIV-1 のレセプターであるCD4 とコレセプターであるCCR5 またはCXCR4 との結合に関与する。また、gp41 はgp120 とレセプターの結合により活性化し、膜融合を引き起こす^[92]。

5) *tat*

*tat*はTatをコードし、ウイルスmRNAの転写を増強する機能を持つ。TatはLTRに存在するTAR領域と結合することにより転写が増強されるが、TARに結合するには宿主由来のCyclin T1 およびCdk9 からなるP-TEFbが必要である。TatとP-TEFbの複合体がTARに結合することによりRNA polymerase II (Pol II) のCTDが過リン酸化され、ウイルスRNAの転写が増強される^[93,94] (図 1-12)。

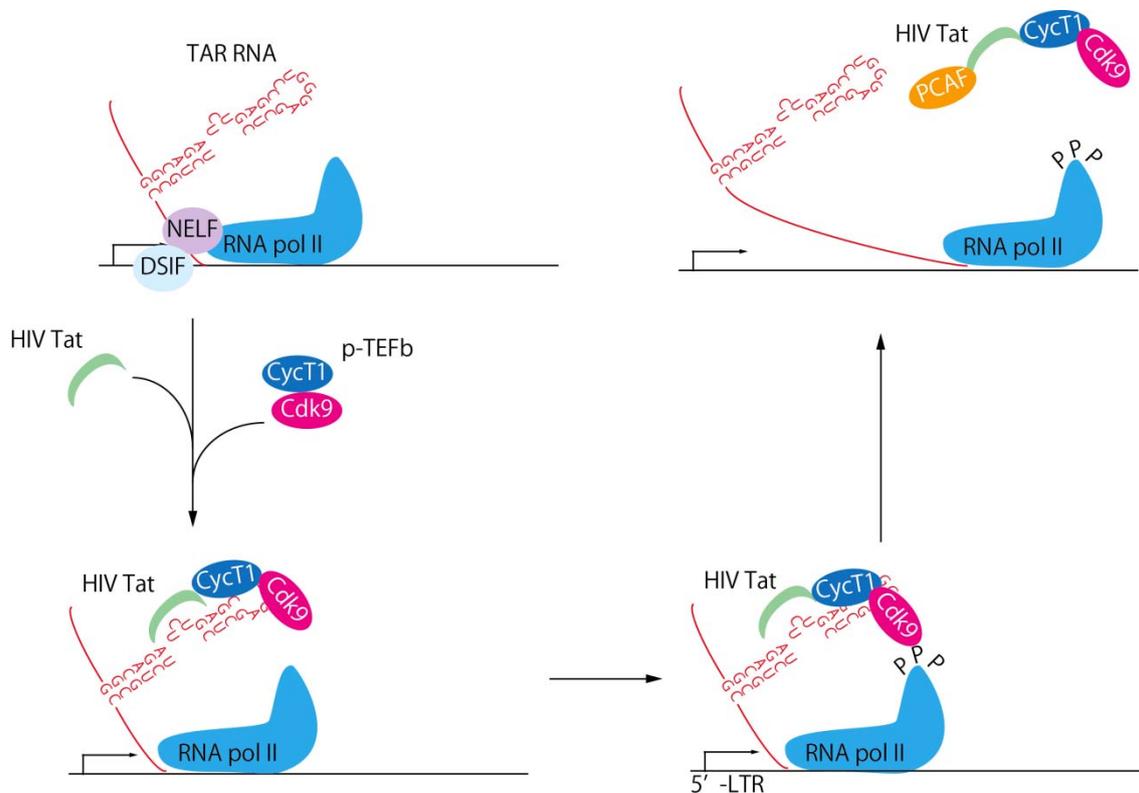


図 1-12 Tat による HIV-1 LTR 転写活性化機構

6) *rev*

*rev*はRevをコードしており、ウイルスmRNAを核から細胞質に輸送する機能を持つ。ウイルスmRNAの輸送にはいくつかの宿主因子が関与していることが報告されている。ウイルスmRNAの*env*領域にはRRE (Rev Responsive Element) という2次構造をもつ領域があり、ここにRevが結合し、その後exportin-1がRevに結合し、Ran-GTPが結合することによりウイルスmRNAが核から細胞質へ輸送される^[95-98]。

7) *nef*

*nef*はNefをコードしている。NefはCD4 およびHLA class Iの発現をエンドサイトーシスの誘導により抑制すると報告されている。しかし、HLA class IについてはすべてのHLA (human leukocyte histocompatibility antigen) 分子の発現を抑制するわけではなく、HLA-A、HLA-Bのみ発現抑制を行っている。また、非ペプチド脂質や糖質抗原の抗原提示にはたらく主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex; MHC) 様分子のCD1dもNefが発現抑制を行っていることが報告されている。これらの宿主因子の発現を抑制することにより、ウイルス重感染の防止や、ウイルス粒子の産生効率の上昇、および細胞障害性T細胞によるウイルス感染細胞の除去などの免疫応答を回避するといった機能を果たしている。これらの免疫関連因子の発現抑制の他にも、Nefが感染細胞のアポトーシスを抑制していることも報告されている^[99-105]。

また、NefはHIV-1 LTRからの転写に対し、負または正の制御をすることが報告されている。現在ではNefと他のエフェクター機能のコンビネーションによりウイルス応答および伝染性を増強すると言われている。しかし、NefによるLTR転写制御の詳しい機構は明らかにされていない^[106-114]。

8) *vif*

*vif*はVifをコードしている。Vifはいくつかの細胞においてHIVの感染性を維持するために必要であることがわかっていたが、その理由はわかっていなかった。しかし、最終的に宿主因子であるAPOBEC3Gが同定され、APOBEC3GはHIV複製抑制活性を有することがわかり、さらにVifはAPOBEC3GのHIV-1複製抑制活性を阻害するはたらきを持つことが報告された。

9) *vpr*

*vpr*はVprをコードしている。Vprは複数の機能をもつことが報告されている。逆転写後のウイルスDNAの核移行、宿主細胞の細胞周期をG2/M期またはG2期での停止能、ウイルスプロモーターの制御、アポトーシスの制御、ウイルスRNAのスプライシングの制御などが報告されており、またいくつかの宿主因子と相互作用することも報告されている^[115-121]。

10) *vpu*

*vpu*はVpuをコードしている。Vpuは宿主細胞の細胞膜に局在しており、ウイルス粒子には取り込まれない。Vpuは、感染後期においてHIVレセプターであるCD4の発現抑制やHIV-1抵抗性宿主因子の阻害によるEnv前駆体タンパク質であるgp160の細胞表面への輸送およびウイルス粒子出芽の補助、NF- κ B活性化の阻害、MHCまたはHLAにおけるCD8陽性T細胞への抗原提示に用いられるHLA-A2、HLA-G1の発現抑制を行うことが報告されている^[122-129]。

また、Vpuはウイルス粒子の放出を抑制するTetherin/BST-2のはたらきを抑制することが報告されているが詳しくは後述する。

これらのタンパク質発現は、一本のウイルスmRNAから行われており、転写された全長のmRNAはゲノムや*gag-pol* mRNAとして機能する。しかし、他のタンパク質については全長のmRNAがスプライシングされることにより発現する。スプライシングされたmRNAは共通して*env*領域が保存されており、Revにより細胞質へ輸送され、それぞれのタンパク質が発現することが報告されている。

第3項 HIV-1 の増殖・複製

感染力をもつ成熟型 HIV-1 は宿主細胞のレセプター (receptor) を介して細胞内に侵入する。HIV-1 では、2種類の異なる細胞表面分子がレセプターとなる。第1のレセプターは CD4 であり、第2の補助レセプター (co-receptor) は炎症の際に白血球を遊走させるケモカインに対する受容体である。gp120 は CD4 にまず結合し、次に gp120 が構造変換し細胞膜を7回貫通する G タンパク質の1つであるケモカインレセプターに結合する。この補助レセプターは、マクロファージの CCR5 という β ケモカインに対する受容体、あるいは T 細胞の CXCR4 という SDF-1 ケモカインに対する受容体に二分される。

レセプターと結合後、膜貫通型 gp41 の N 末端の細胞融合領域を介して、ウイルスと細胞膜との細胞膜融合が細胞膜表面上の脂質ラフトにおいて起こる。そして、細胞内へウイルスゲノム RNA が運ばれ、細胞質内に遊離される段階を脱殻という。HIV の場合は細胞膜、あるいは、膜直下において脱殻する^[92]。

次に、ウイルス粒子により持ち込まれた tRNA をプライマーとしてウイルスゲノム RNA のプライマー結合領域 (primer binding site ; PBS) から逆転写酵素により、RNA は逆転写される。PBS は RNA の 5' 近傍にあり、キャップの方向に DNA 合成が始まる。PBS からキャップまでが U5-R といわれる部位に相当する。R 配列はウイルスの 3' 側にもあり、ウイルス DNA の合成はこの R 部位で 5' 側から 3' 側に移行する。それからさらに、マイナス鎖 DNA を合成し、次にウイルス RNase H により RNA が除去されるが、一部除去されない RNA をプライマーとして次にプラス鎖 DNA が合成され、二本鎖 DNA (dsDNA) に変換される。その結果、両端に LTR を持ったウイルス dsDNA が完成する。この過程においては重合したアクチンと結合した逆転写酵素複合体 (reverse transcription complex; RTC) を形成する。そして、ウイルス dsDNA は宿主染色体に自己の DNA を組み込ませるインテグラーゼ (IN), Matrix (MA), Vpr などと複合体 (preintegration complex; PIC) を形成し、細胞内の微小管に沿って、核膜孔を越えて核移行する。PIC の中では IN の作用により、まず、3' 末端の 2 bp の DNA が除去され、OH 基が露出し、核内に移行して染色体 DNA と結合する。その後、染色体 DNA とウイルス DNA との間に生じたギャップは宿主の修復酵素により埋められ、インテグレーションが完了する。このインテグレーションの前に IN に結合する核内タンパク質である BAF (barrier-to-autointegration factor) は、ウイルス DNA が核内でウイルス自身の DNA にインテグレーションしないように結合し、転写調節に関与する Ini1 (IN-interactor 1) と HMGA1 (high mobility group protein 1) はインテグレーション活性に必須の宿主因子である^[130-132]。

染色体に組み込まれたことによりウイルス遺伝子は安定する。そして、プロウイルスから mRNA が合成され、ウイルス自身の複製段階に入る。染色体 DNA に由来するので宿主の mRNA と全く同じように Pol II により mRNA が合成されるが、この段階で 1 分子のプロウイルスが数千分子の mRNA へ変換される。このウイルス RNA の転写効率はプロウイルス DNA の 5' 非翻訳領域に存在するプロモーターに結合する SP-1、そして、エンハンサーに結合する NF- κ B などの宿主転写因子により制御される。さらに、このウイルスの転写はウイルス由

来のTatにより制御されている。TatはCDK9 という核内宿主因子と結合し、Pol IIのC末端の高リン酸化を促すことによりウイルスRNAの伸張反応を誘導する^[132]。

転写反応により合成されたウイルスRNAはスプライシングの違いにより、それぞれ2.0 kb, 4.0 kb, 9.2 kb の分子がある。2.0 kb のものは double splicing されたものであり、リボソームに移行して Tat と Rev に翻訳される。一方、高分子 RNA であるため、single spliced RNA (4.0 kb) と unspliced RNA (9.2 kb) は単独では核膜孔を通ることができず、核外移行因子 Crm1 (chromosome region maintenance) と Ran-GTPase の作用を必要とする。Rev は核内において高分子 RNA と結合した後、Crm1・Ran-GTPase と結合して核外に輸送することにより、ウイルス構造タンパク質の翻訳が実行される。ここでも宿主因子がきわめて重要な役割を担う。

ウイルス粒子を形成するGagと次の感染過程に必要な (RT, IN)の前駆体 (Gag-Pol) は翻訳後、細胞質においてRNase Lの阻害剤の一つであるHP68 により多量体を形成し、さらに粒子内にpackagingされるウイルスRNAと結合して細胞膜に移行する。一方、Envは小胞体 (endoplasmic reticulum; ER), ゴルジ体を経て糖鎖修飾され、マクロファージでは細胞内のlate endosome膜においてGagと会合し最終的にウイルス粒子として組み込まれる^[133-135]。

最後に、ゲノム RNA が内包されたウイルス粒子が細胞外へ放出される。この放出過程には、細胞表面から種々の受容体分子が細胞内へ輸送され、リソソームにおいて破壊される過程にかかわる ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) 分子群が直接関与することが報告されている。ウイルス粒子は、細胞外に放出された後、ウイルス粒子内のプロテアーゼが活性化して Gag ならびに Pol がプロセッシングされ、成熟ウイルス粒子を形成し、感染性ウイルスが次の標的細胞へ感染する (図 1-13)。

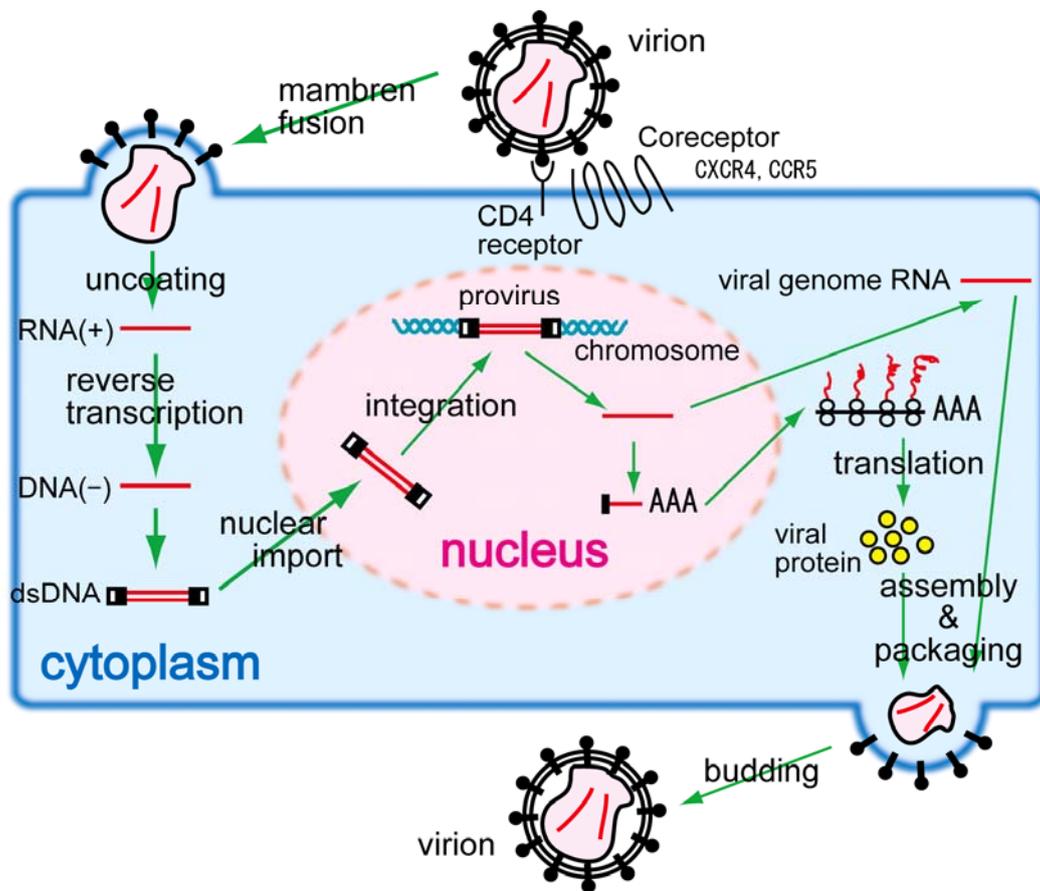


図 1-13 HIV-1 の複製サイクル

第4節 レトロウイルス複製を制御する宿主因子

1) APOBEC3 ファミリー

2002年にHIV-1複製抑制因子としてAPOBEC3ファミリーであるAPOBEC3Gが発見され、その後APOBEC3G以外のAPOBEC3ファミリーにもHIV-1複製抑制作用があることが報告された。APOBEC3Gは、HIV-1ウイルス粒子内に取り込まれ、APOBEC3Gが取り込まれたウイルス粒子が次の標的細胞に感染し、逆転写の際にマイナス鎖ウイルスDNAのdCを脱アミノ化することによりdUに変異させる(図1-14)。これにより、プラス鎖ウイルスDNA中にGからAへのhyper-mutationを引き起こさせ、ウイルスの複製が阻害されることが報告されている。また、GからAへのhyper-mutationの蓄積によるHIV-1複製阻害効果のほかに、宿主のDNA修復酵素であるuracil-DNA glycosylaseによりマイナス鎖ウイルスDNAが分解されること、DNAにウラシルが混在することによりDNA合成が阻害されることによるものであるとの報告も出されている^[136-143]。

停止期のリンパ組織中のCD4陽性T細胞ではHIV-1に感染するが、末梢血中のCD4陽性T細胞へはHIV-1は感染しない。これらの細胞にはAPOBEC3Gが含まれているが、このような差が出るのは、APOBEC3Gのcytidine deaminaseによる抗HIV-1活性のみでは説明できない。この疑問に対して、APOBEC3Gには酵素活性がある低分子量の状態(low-molecular-mass; LMM)と酵素活性がない高分子量の状態(high-molecular-mass; HMM)があることが示された。これは、LMMが末梢血由来の停止期CD4陽性T細胞および単球に存在し、これが、HIV-1のエントリー初期をブロックするためだと考えられた。実際に、停止期のCD4陽性T細胞中のLMM-APOBEC3GをsiRNAによりknock-downするとHIV-1に感染することにより示された^[143,144]。

その後研究が進められ、LMM-APOBEC3Gを含んでいるHIV-1は次の感染において、逆転写が阻害されることによりHIV-1複製を阻害していることがわかった。末梢血由来の停止期CD4陽性T細胞にHIV-1を感染させると、dGからdAへのhyper-mutationは起こらないが、逆転写は遅くなり、HIV-1の産生が抑制されていることが報告されている^[144-146]。

APOBEC3GのHIV-1複製抑制活性に対して、HIV-1はVifをコードしており、VifがどのようにAPOBEC3GのHIV-1複製抑制活性を中和するかに関しても、次々と明らかにされている。まず、Vif存在下では、ウイルス粒子中へのAPOBEC3Gの取り込みが特異的に阻害されることが示された。次に、ウイルス産生細胞中におけるAPOBEC3Gのタンパク質の発現量は、Vifの共発現により減少しており、mRNAの発現量に変化がないことから、転写後発現制御の存在が示唆された。さらに、proteasome阻害薬を用いてウイルス産生細胞を処理したところ、Vif存在下においてもAPOBEC3Gの発現量が回復したことより、VifによるAPOBEC3Gタンパク質の発現量調節には、ubiquitin-proteasome分解経路の関与が示された。しかしながら、一方で、VifはAPOBEC3Gタンパク質の翻訳に影響を与えるという報告も存在する^[147-152]。

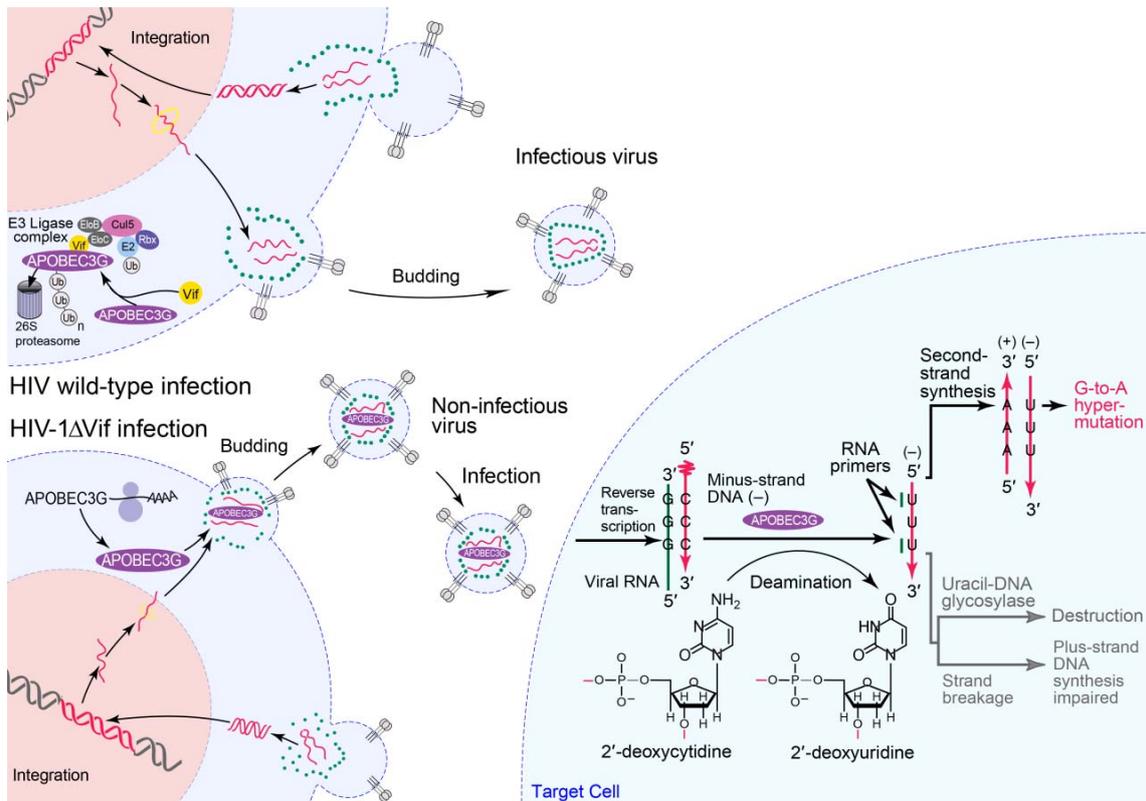


図 1-14 APOBEC3G による HIV-1 抑制機構

2) TRIM5α

HIVは、ヒト以外では比較的近縁なチンパンジーなどの細胞には感染できるが、アカゲザルやフクロウサルなどの細胞には感染できないことが以前より報告されていた^[153]。そして、2004年にアカゲザル細胞でのHIV抵抗性に付与する細胞性因子としてTRIM5α (tripartite motif protein 5α) が分離同定された^[154]。TRIM5αはRBCC (RING/B-box/coiled-coil) とよばれる共通のモチーフをもつ一群のタンパク質 (TRIM) ファミリーに属する。ヒトではTRIMファミリーをコードする遺伝子が70種類近く同定されており、TRIM5αはTRIM5遺伝子から発現される4種類のスプライシングアイソフォームの内の1つである。ただし、他のアイソフォームと異なり、TRIM5αはRBCCモチーフに続くC末端領域にB30.2 (SPRY) ドメインをもつ^[153,155]。また、フクロウサル細胞でもTRIM5αがHIV抑制因子として機能するが、この細胞ではLINE-1 (long interspersed nuclear element-1) トランスポゾンの転移によってTRIM5遺伝子中にcyclophilin A (Cyp A) のORFが挿入され、結果的にSPRYドメインがCypAと置き換わった融合タンパク質 (TRIMcyp) が発現している^[156]。

TRIM5αはCAを標的とすることでHIV増殖を抑制する。ウイルスの逆転写反応はCAを中心としたウイルス性コアタンパク質内で行われるが^[153]、TRIM5αはこのCAに直接ない

しは間接的に結合すると考えられ、その結合部位はTRIM5 α の場合はSPRYドメイン、TRIMcypの場合はCypAドメインである。自然免疫という観点では、TRIM5 α はウイルスコア構造を特異的に識別する“パターン認識レセプター”であると考えられることができる。CAへの結合がウイルスコアにどのような影響を与えるのかはわかっていないが、逆転写反応の途中でコア構造が破壊され、ウイルスDNAの合成が停止するのではないかと考えられている^[153,156,158]。TRIM5 α のRINGドメインは多くのE3 ubiquitin ligaseにも見られるが^[155]、CAが細胞内でユビキチン化されるという報告はなく、プロテアソーム阻害剤を用いてもウイルスの抑制は完全に解除されない。従って、TRIM5 α によるHIV感染阻害過程において、タンパク質分解経路が関与するかは明らかにされていない^[153,156]。

しかし、ヒトTRIM5 α はHIVに対してほとんど抑制効果をもたない。ある種のサル由来のTRIM5 α がHIVの感染を阻害できる。一方、ヒトTRIM5 α はマウスやウマなどのレトロウイルスの感染を抑制する。つまり、HIVは何らかの形でヒトTRIM5 α から逃れるように進化した結果、ヒトに伝播できるようになったと考えられる。しかし、最近では、TRIM5 α 以外でHIVの複製を抑えるヒトのTRIMタンパク質がいくつか報告されている^[159,160]。

3) Tetherin/ BST-2/ CD317

HIV Vpuは感染細胞からのウイルス粒子の放出を促進する機能を有するが、この機能は細胞種特異的である^[161]。Vpu欠損 (Δ Vpu) HIVのウイルス粒子放出は、HeLa細胞では抑制されるが、COS細胞では影響を受けない^[162]。そして、HeLa細胞とCOS細胞のheterokaryonでもVpu依存的なウイルス粒子の放出抑制が見られたことから、HeLa細胞のような細胞にはVpuによって中和されるHIV抑制機構が存在するのではないかと考えられてきた^[162]。ある種のヒト細胞をインターフェロン (interferon; IFN) α で処理した場合でも、同様のVpu依存的なウイルス粒子の放出阻害が見られるが、BieniaszらはIFN α 処理によって発現が亢進する分子群をマイクロアレイ法で解析し、 Δ Vpu HIVの粒子放出を抑制する因子としてCD317を同定し、これをTetherinと名付けた。TetherinはBST-2 (bone marrow stromal cell antigen 2) とも呼ばれ、GPI (glycosylphosphatidylinositol) アンカー型の膜分子である。つまり、細胞膜表面に様々なタンパク質を“つなぎ止める (tether)”機能を持つ。そして、この作用によってVpu非存在下ではHIV粒子は細胞膜上にトラップされて、感染細胞から遊離できなくなる^[163]。しかし、VpuはTetherinを細胞膜表面から消失させることでその抑制を解除することが明らかとされた^[163,164]。

第2章 HTLV-1 Rex による RNA silencing 機構の制御

第1節 はじめに

RNA silencing機構は細胞の遺伝子発現を制御するために備わった機構であるが、最近になり多様なウイルスにおいてその複製と非常に密接な関係があることがわかってきた。これまでにHIV-1にコードされるmiRNA^[165-172]、および宿主にコードされるmiRNAがHIV-1複製を制御することが明らかにされている^[173-179]。また、HTLV-1においては現在までにウイルスにコードされるmiRNAの報告はないが、HTLV-1 RNAは3'UTRにRxREと呼ばれるstem-loop構造をとるため、RNA silencing機構の標的となりうる。HTLV-1感染細胞やATL患者の細胞では宿主miRNAの発現量が増加していることも報告され^[180-182]、ATL発症とRNA silencing機構の関係は近年精力的に研究されている。

さらに、ウイルスは自身のRNAを宿主の持つRNA silencing機構から逃避させるため、RNA silencing suppressor (RSS) をコードすることが明らかにされている^[183]。HIV-1ではTatがDicerとの相互作用によりDicerの機能を阻害するというRSS活性を有していることが報告されており^[184,185]、HIV-1と同じくレトロウイルス科に属するHTLV-1もRSSタンパク質を有すると考えた。しかし、Tatと同様なウイルス転写活性化機能を有するHTLV-1 TaxにはRSS活性がないと報告されている^[186]。そこで、Tatと同様にRNA結合能を有するHTLV-1 RexによるRNA silencing機構への影響を検討した。

第2節 Rex による Dicer の機能阻害

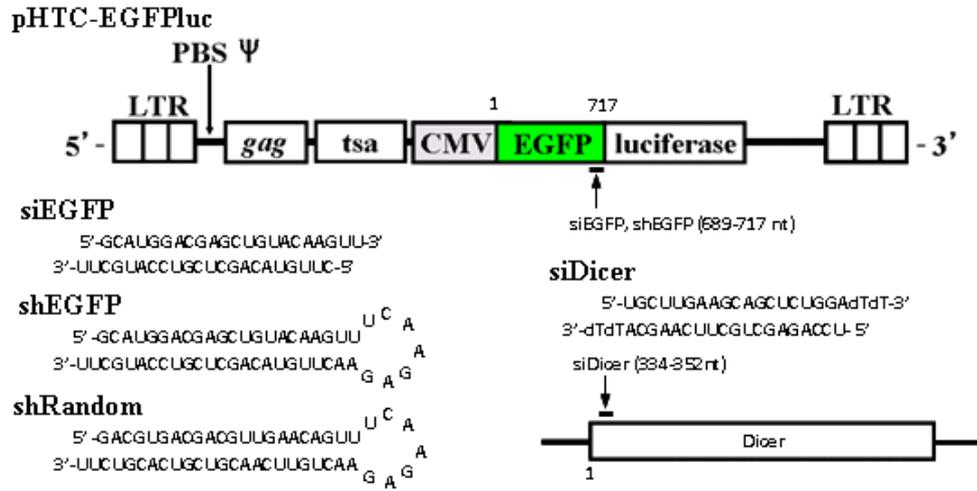
第1項 実験方法

293T細胞を播種し、翌日にHTLV-1トランスファーベクター (pHTC-EGFP_{luc}) 500ng, 終濃度25 nMのEGFPを標的とするshRNA (shEGFP) またはsiRNA (siEGFP), コントロールのshRNA (shRandom), Dicerを標的とするsiRNA (siDicer) およびRex発現プラスミド (pSR α -Rex) 500 ngをX-tremeGENE siRNA Transfection Reagent (Roche Diagnostics) を用いてco-transfectionした。48時間後にEGFPの発現を蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000; KEYENCE) を用いて観察した。Assay Buffer (100 mM HEPES, 0.5% Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol) により細胞を溶解し, フルオロメーター (Quad4 monochromator; Tecan) を用いてEGFP発現量を定量した。

第2項 結果および考察

Rex が RNA silencing 機構を制御するかを検討した結果, pHTC-EGFP_{luc} のみの EGFP 発現量を 100%とした場合, shEGFP の co-transfection では 15%, siEGFP の co-transfection では 12%, siEGFP および siDicer の co-transfection では 25%, shEGFP および siDicer の co-transfection では 54%, siEGFP および pSR α -Rex の co-transfection では 22%, shEGFP および pSR α -Rex の co-transfection では 60%であった (図 2-1 B)。

A



B

	EGFP	DIC	Merged	% expression
pHTC-EGFPluc				100%
pHTC-EGFPluc + shRandom				98%
pHTC-EGFPluc + shEGFP				15%
pHTC-EGFPluc + siEGFP				12%
pHTC-EGFPluc + shEGFP + siDicer				54%
pHTC-EGFPluc + siEGFP + siDicer				25%
pHTC-EGFPluc + pSRα-Rex				95%
pHTC-EGFPluc + shEGFP + pSRα-Rex				60%
pHTC-EGFPluc + siEGFP + pSRα-Rex				22%

図 2-1 Rex による Dicer の機能阻害 (A) pHTC-EGFPluc, siEGFP, shEGFP, shRandom, siDicer の構造. (B) 図で示した条件で 293T 細胞に pHTC-EGFPluc (500 ng), 各 siRNA または shRNA (25 nM) および pSR α -Rex (500 ng) を co-transfection し, 48 時間後に EGFP の発現を蛍光顕微鏡を用いて観察し, 細胞溶解物を回収してフルオロメーターにより EGFP 発現量を定量した.

この結果より, Rex の発現は shRNA の効果を抑制するが, siRNA の効果には影響しない. つまり, Rex は shRNA から siRNA へと成熟させる Dicer の機能を阻害することが明らかとなった. また, この RNA silencing 機構の抑制効果は Dicer のノックダウンとほぼ同程度であった. このことから, Rex は Dicer の機能を阻害することで RNA silencing 機構を制御することが示唆された.

第3節 Rex による Dicer の機能阻害機構の解明

第1項 実験方法

1) Rex 変異体発現プラスミドの構築

pSR α -Rexを鋳型に primer (Rex-RRR5-7DDD; 5'-TGCCCAAGACCGATGACGACCCCCGC CGATCCCAAAG-3', 5'-GCAGCTCGCTTGAGGAGTCTC-3', Rex-LL90,92AA; 5'-TCGTCACG CCAGATCTGCCACCTGTCCAGAGCATCAG-3', 5'-TGTAGGCGGGCCGAACATAGTC-3', Rex-YW64,65DL; 5'-CAGTTCCGCTAGCGCCGACTCCCCTCCTTCCCCACC-3', 5'-TAGAGC TGAGCCGATAACGC-3', Rex-THF119-121DL; 5'-CCCCAGATCTGCCTCCTTCCCTCCAGGC CATGCGC-3', 5'-GGTTGTATGAGTGATTGGCG-3') を用いて KOD-Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO) により PCR を行い, Rex 変異体発現プラスミド (pSR α -Rex-RRR5-7DDD, pSR α -Rex-LL90,92AA, pSR α -Rex-YW64,65DL, pSR α -Rex-THF119-121DL) を構築した.

2) Rex リコンビナントタンパク質発現プラスミドの構築

pSR α -Rex, pSR α -Rex-RRR5-7DDD, pSR α -Rex-LL90,92AA, pSR α -Rex-YW64,65DL, pSR α -Rex-THF119-121DL を鋳型に primer (5'-GACTGGATCCATGCCCAAGACCCGTCGGAG -3', 5'-AGTCGTCGACTCACGTGGGGCAGGAGGGGC-3') を用いて KOD-plus- (TOYOBO) により PCR を行った. PCR 産物と pQE-30 (Qiagen) を *Bam* HI および *Sal* I により制限酵素処理し, Ligation high (TOYOBO) を用いて pQE-Rex, pQE-Rex-RRR5-7DDD, pQE -Rex-LL90,92AA, pQE -Rex-YW64,65DL, pQE -Rex-THF119-121DL の構築を行った.

3) Rex リコンビナントタンパク質の精製

Rex リコンビナントタンパク質発現プラスミドを *Escherichia coli* M15 strain (Qiagen) に transformation し, LB 培地で 37°C, 16 時間培養後, 100 μ g/ml ampicillin を含む LB 培地に 1/40 量加えて 37°C で培養した. OD₆₀₀ が 0.8 に達したところで終濃度 1 mM となるように isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し, 16°C で 16 時間培養した. 5000 \times g で 5 min 遠心し, 上清を捨てて 1 M NaCl, 1% Triton X-100, 3 mM dithiothreitol (DTT) を含む phosphate-buffered saline (PBS) を加えて大腸菌を溶解させ, 超音波破碎した. 24,000 \times g で 1 h 遠心し, 上清に Ni-NTA agarose (Qiagen) を加えて 4°C で 2 h インキュベートした. Ni-NTA agarose を Wash Buffer (50 mM imidazole, 1 M NaCl, 1% Triton X-100, and 3 mM DTT を含む PBS) で洗浄し, Elution Buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole, 1% Triton X-100) で溶出した. 精製した Rex リコンビナントタンパク質は Storage buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 20% glycerol) で透析し, Buffer 置換した.

4) Pull-down assay

293T 細胞を Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol,

1% Triton X-100) で溶解し, Rex リコンビナントタンパク質 5 μ g および Ni-NTA agarose を加えて 4°C で 2 h インキュベートした. Ni-NTA agarose を Wash Buffer (50 mM imidazole, 1 M NaCl, 1% Triton X-100, 3 mM DTT を含む PBS) で洗浄し, 2 \times sample buffer を加えて 95°C で 5 min 処理した. 遠心後, 上清を Western Blotting した.

5) 免疫沈降

293T 細胞を Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1% Triton X-100) で溶解し, Rex リコンビナントタンパク質 5 μ g, および anti-Dicer 抗体 (Santa cruz Biotechnology) または anti-His 抗体を結合させた Dynabeads Protein G (Invitrogen) を加えて 4°C で 2 h インキュベートした. Dynabeads Protein G を PBS で洗浄し, 2 \times sample buffer を加えて 95°C で 5 min 処理した. 磁石に固定後, 上清を Western Blotting した.

6) Rex 変異体による Dicer の機能阻害の検討

293T 細胞を播種し, 翌日に pHTC-EGFP_{luc} 500ng, 終濃度 25 nM の shEGFP および pSR α -Rex または Rex 発現変異体発現プラスミド (pSR α -Rex-RRR5-7DDD, pSR α -Rex-LL90,92AA, pSR α -Rex-YW64,65DL, pSR α -Rex-THF119-121DL) 500 ng を X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent を用いて co-transfection した. 48 時間後に EGFP の発現を蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-8000; KEYENCE) を用いて観察した. Assay Buffer (100 mM HEPES, 0.5% Triton X-100, 1 mM CaCl₂, 1 mM β -mercaptoethanol) により細胞を溶解し, フルオロメーター (Quad4 monochromator; Tecan) を用いて EGFP 発現量を定量した.

第2項 結果および考察

第 2 節では, RexがDicerの機能を阻害することを明らかにした. HIV-1 TatによるRNA silencing機構の抑制は, TatとDicerの相互作用によるDicerの機能阻害によって引き起こされることが報告されている^[184,185]. そこで本節では, RexによるDicerの機能阻害機構の解明を行った.

最初に, Rex と Dicer の相互作用解析を行った. ヒスチジンタグを付加した Rex のリコンビナントタンパク質 (His-Rex) および 293T 細胞溶解物を用いて Ni-NTA agarose による pull-down assay または anti-Dicer 抗体による免疫沈降法により検討を行った. その結果, Rex は Dicer と相互作用することが明らかとなった (図 2-2).

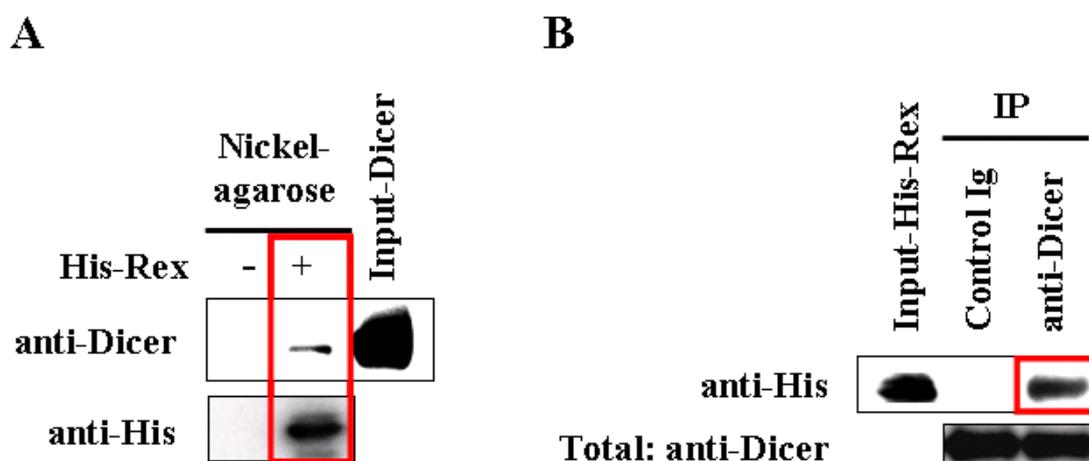


図 2-2 Rex と Dicer の相互作用解析 (A) His-Rex および 293T 細胞溶解物を用いた Nickel-agarose による pull-down assay. (B) His-Rex および 293T 細胞溶解物を用いた anti-Dicer 抗体による免疫沈降法.

次に, Rex と Dicer の相互作用が明らかとなったため, Rex の機能ドメインに変異を入れた Rex 変異体リコンビナントタンパク質および 293T 細胞溶解物を用いて anti-His 抗体による免疫沈降法により検討を行った. その結果, RBD/NLS に変異を入れた Rex 変異体 (His-Rex-RRR5-7DDD) および NES に変異を入れた Rex 変異体 (His-Rex-LL90,92AA) では弱い相互作用がみられたが, Multimerization domain に変異を入れた Rex 変異体 (His-Rex-YW64,65DL または His-Rex-THF119-121DL) では相互作用がほぼみられなかった (図 2-3 B).

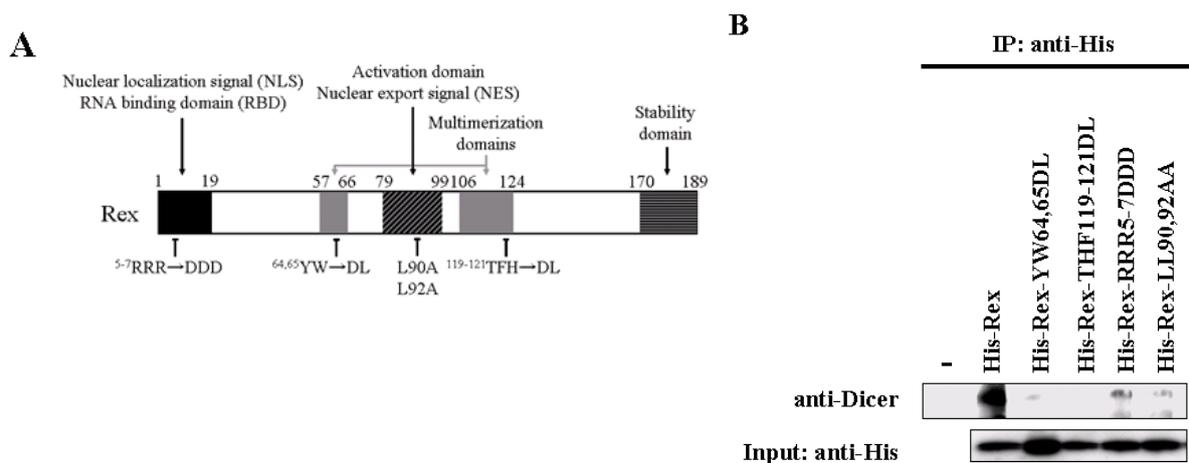


図 2-3 Rex 変異体と Dicer の相互作用解析 (A) Rex の構造. (B) His-Rex 変異体および 293T 細胞溶解物を用いた anti-His 抗体による免疫沈降法.

さらに、Rex 変異体を用いて相互作用と Dicer の機能阻害との関係を明らかにするため、第 1 節図 2-1 と同様の実験を行った。その結果、全ての Rex 変異体は Dicer の機能に影響しないことが明らかとなった (図 2-4)。

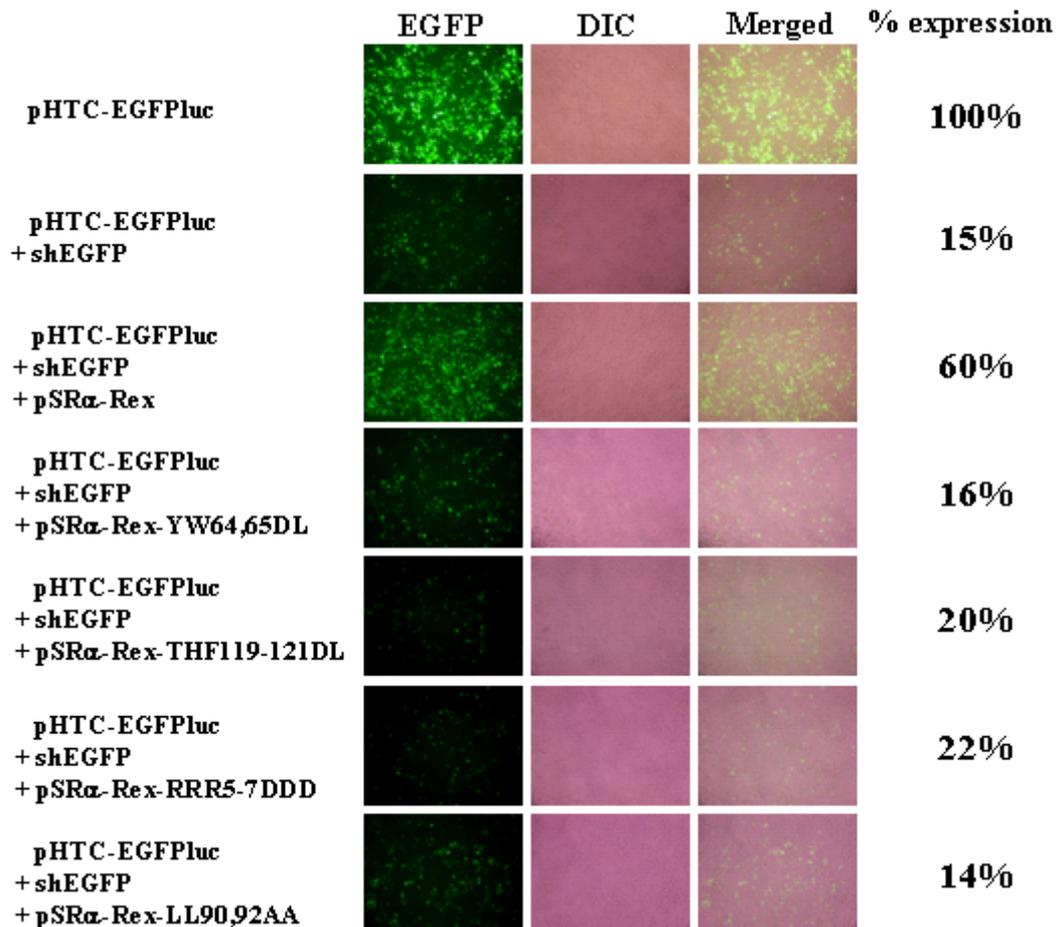


図 2-4 Rex 変異体による Dicer の機能への影響 293T 細胞に pHTC-EGFPluc (500 ng), shEGFP (25 nM) および Rex 変異体発現プラスミド (500 ng) を co-transfection し, 48 時間後に EGFP の発現を蛍光顕微鏡を用いて観察し, 細胞溶解物を回収してフルオロメーターにより EGFP 発現量を定量した.

以上の結果より, Rex は Dicer と相互作用することで Dicer の機能を阻害することが明らかとなった. さらに, Rex と Dicer の相互作用には Rex の多量体化が重要な役割を果たすことも明らかとなったが, Dicer の機能を阻害するためには Rex の全ての機能を備えている必要があることが示唆された.

第4節 Dicer の knock-down によるウイルスタンパク質発現への影響の解析

第1項 実験方法

293T 細胞を播種し、翌日に HTLV-1 パッケージングプラスミド (pCMV-HT- Δ env) 500ng および終濃度 0, 5, 10, 25 nM の siDicer を X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent を用いて co-transfection した。48 時間後に細胞溶解物を回収し、HTLV-I/II p19 Antigen ELISA Kit (ZeptoMetrix) により HTLV-1 p19 Gag の発現および western blotting 法により Dicer の発現を解析した。

第2項 結果および考察

Dicer が HTLV-1 タンパク質発現に及ぼす影響を検討するために、293T 細胞に HTLV-1 パッケージングプラスミド pCMV-HT- Δ env および siDicer を co-transfection した。48 時間後に細胞溶解物を回収し、ELISA 法により HTLV-1 p19 Gag の発現および western blotting 法により Dicer の発現を確認した。その結果、siDicer の濃度依存的に Dicer の発現量は減少し、p19 Gag の発現量は増加した (図 2-1 B)。

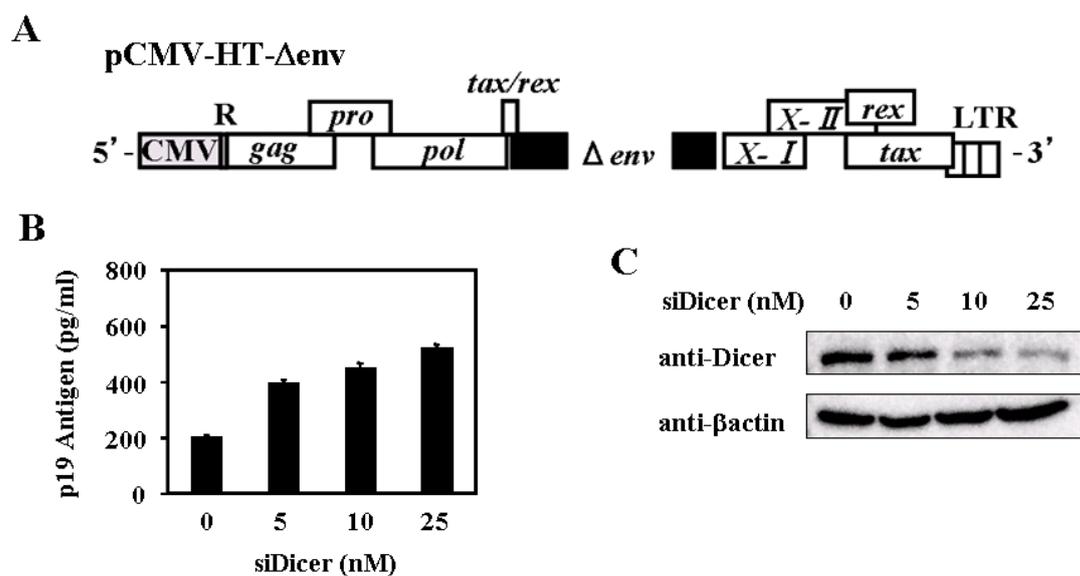


図 2-5 Dicer の knock-down による HTLV-1 p19 Gag 発現への影響 (A) pCMV-HT- Δ env の構造。293T 細胞に pCMV-HT- Δ env (500 ng) および siDicer (0, 5, 10, 25 nM) を co-transfection し、48 時間後に細胞溶解物を回収し、ELISA 法により HTLV-1 p19 Gag の発現 (B) および western blotting 法により Dicer の発現 (C) を確認した。

この結果より、Dicer の knock-down は HTLV-1 タンパク質発現を上昇させることを明らかにした。このことから、ウイルス RNA は Dicer の標的となることおよび宿主 miRNA による翻訳抑制という RNA silencing 機構の標的となることが示唆された。

第5節 Rex によるウイルス RNA の安定化

第1項 実験方法

293T細胞にpHTC-EGFPluc 500 ngおよびpSR α -Rex 500 ngをLipofectamine2000 (Invitrogen) を用いてco-transfectionした. 経時的に細胞を回収し, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) により total RNAを抽出した. 抽出したtotal RNAおよびDIG標識RxRE-probe (5'-DIG-GGTAGGCTC CAAGGGAGCGCCGGACAAAG-3') をhybridizeさせ, RPA III Ribonuclease Protection Assay Kit (Ambion) を用いてRNase-protection assayを行った.

第2項 結果および考察

第2節および第3節では, Rex が Dicer と相互作用することで Dicer の機能を阻害し, RNA silencing 機構を制御することを明らかにした. さらに第4節では, Dicer の knock-down が HTLV-1 タンパク質発現を上昇させることを明らかにした. これらの知見より, Rex は3'末端に RxRE という安定な二次構造をとるウイルス RNA を RNA silencing 機構から逃避させることでウイルス複製を有利にしているのではないかと考えられる. そこで, 本節では Rex がウイルス RNA に及ぼす影響を検討するため, 293T細胞に pHTC-EGFPluc および pSR α -Rex を co-transfection し, 経時的に total RNA を回収して RxRE に対する probe を用いた RNase-protection assay を行った. その結果, Rex を発現させていない場合は transfection 後 24 時間でウイルス RNA の発現がみられなかったのに対し, Rex を発現させた場合は transfection 後 48 時間までウイルス RNA の発現がみられた (図 2-6).

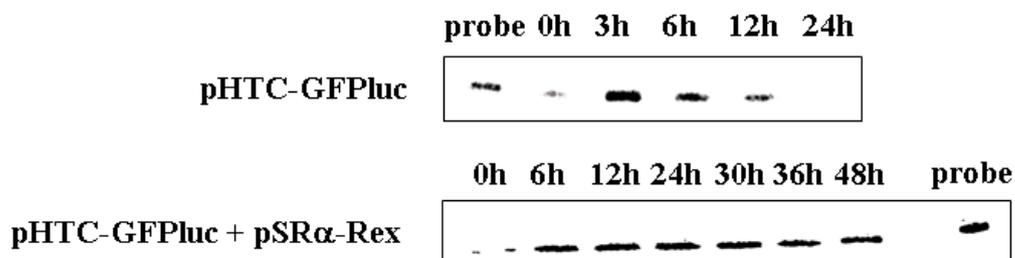


図 2-6 Rex によるウイルス RNA 発現への影響 293T細胞に pHTC-EGFPluc (500 ng) および pSR α -Rex (500 ng) を co-transfection し, 経時的に total RNA を回収して RxRE に対する DIG 標識 probe (5'-DIG-GGTAGGCTCCAAGGGAGCGCCGGACAAAG-3') を用いた RNase-protection assay を行った.

この結果より, Rex の発現はウイルス RNA を安定化に関与することが明らかとなった. すなわち, Rex は Dicer の機能を阻害することによりウイルス RNA を RNA silencing 機構から逃避させることでウイルス複製を有利にしていることが示唆された.

第6節 まとめ

第2節では, HTLV-1 にコードされる Rex が Dicer の機能を阻害することを明らかにした. 第3節では Rex による Dicer の阻害機構は Rex と Dicer の相互作用によること, Dicer との相互作用には Rex の多量体化が重要な役割を果たすこと, さらに Dicer の機能を阻害するためには Rex の全ての機能を備えている必要があることがわかった. また, 第4節では Dicer の knock-down は HTLV-1 タンパク質発現を上昇させることがわかった. 最後に第5節では Rex の発現はウイルス RNA を安定化することを明らかにした.

以上の結果より, ウイルス RNA は Dicer の標的となりうることおよび宿主 miRNA による翻訳抑制という RNA silencing 機構の標的となりうることが示唆された. さらに, Rex は Dicer の機能を阻害することによりウイルス RNA を RNA silencing 機構から逃避させることでウイルス複製を有利にしていることを見出した (図 2-7).

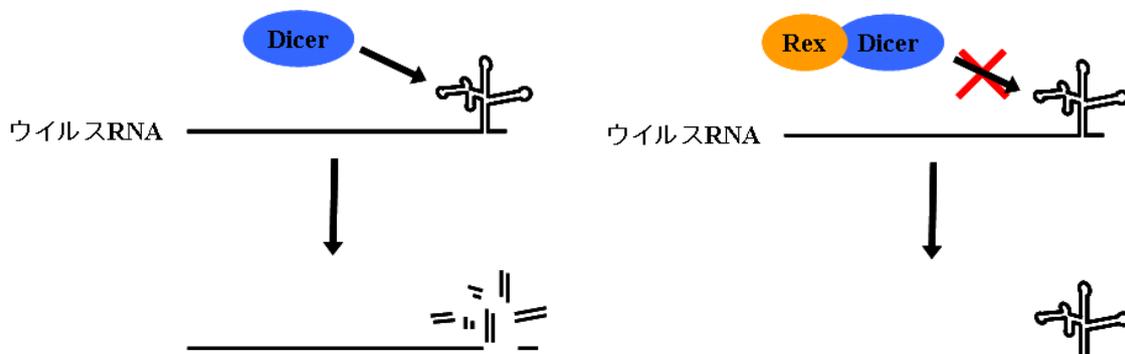


図 2-7 Rex による RNA silencing 機構の制御機構

第3章 ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染制御

第1節 はじめに

HIV-1 を始めとするレトロウイルスは、宿主細胞への感染後ウイルス粒子内の RNA ゲノムが細胞質で DNA に逆転写され、プロウイルスが細胞のゲノム DNA に組み込まれて宿主遺伝子同様にふるまう。プロウイルス DNA からの転写過程では宿主遺伝子と同様に mRNA の複製が同じ鋳型 DNA から繰り返し起こる。しかも、HIV-1 では自身の持つ転写活性化因子 Tat によってこの段階が特に転写伸長過程も含めて著しく亢進している。また、HIV-1 に感染した生体内ではウイルスが 10-20 年もの間潜伏感染を持続させている。この潜伏感染の維持には多数の宿主転写抑制因子 (AP-4, YY-1 など) が関わっている。一方、潜伏感染している細胞に外部から多くの要因が作用すると、宿主転写活性化因子 (NF- κ B, NFAT-1, Sp-1 など) が仲介して転写レベルでウイルスの複製が開始される。さらに、細胞内でプロウイルス DNA を取り巻くクロマチン構造が転写活性に決定的な作用を及ぼすことが明らかになってきた。例えば、ある種の嫌気性菌は嫌気性解糖の最終産物として多量の酪酸を産生するが、酪酸はヒストン脱アセチル化酵素阻害作用を持ち、転写抑制的なクロマチン構造を構成する脱アセチル化ヒストンに作用してそのアセチル化を促す結果、潜伏感染ウイルスの転写を誘導する。

HIV-1 は潜伏感染することで、感染細胞を宿主免疫から逃避させながら長い期間をかけて宿主免疫機能を破綻させる。さらに、HIV-1 の潜伏感染は治療という観点からみると非常にやっかいな問題となる。既存の HIV-1 治療薬はウイルス酵素の阻害剤が中心となっているが、潜伏感染によりウイルス複製が抑制されているとウイルス酵素の発現が弱く、治療薬の効果が十分に得られない。

このような HIV-1 の潜伏感染治療の問題点を解決するためには、ウイルスの転写抑制を解除して宿主免疫から逃避させることなく、短期間に HIV-1 治療薬でウイルス感染細胞を排除することが効果的であると考えられる。そこで、本章では HIV-1 潜伏感染を制御する宿主因子を明らかにすることを目的として DNA 損傷の修復に関わる GADD45 の転写調節に関わる KRAB-Zinc finger タンパク質 (KRAB-ZNF) の一種である ZBRK1 (図 3-1) に着目し、HIV-1 の潜伏感染を制御するか否か検討を行った。

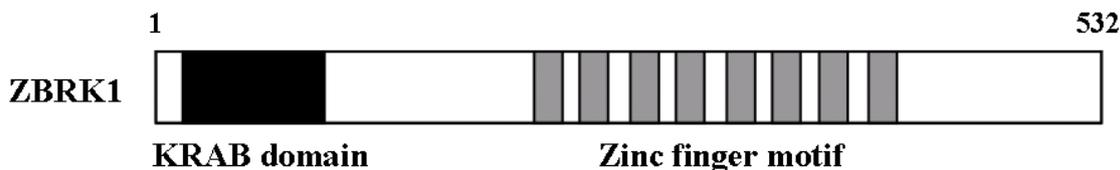


図 3-1 ZBRK1 のタンパク質構造

第2節 ZBRK1 による HIV-1 LTR 転写活性抑制

第1項 実験方法

1) ZBRK1 発現プラスミドの構築

293T 細胞から RNeasy Plus Mini Kit を用いて total RNA を抽出した. ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し, primer (5'-GTCCCCGGAATGATCCAGGCCAG GAATC-3', 5'-AGTCCTCGAGCTATGGGTTTTCTGTAAACATAAAATAAG-3') を用いて KOD-plus-により PCR を行った. PCR 産物を *Sma* I および *Xho* I により制限酵素処理し, *Sma* I および *Sal* I により制限酵素処理した pNFLAG-Bos に Ligation high を用いて Ligation し, pNFLAG-ZBRK1 を構築した.

2) ZBRK1 による HIV-1 LTR 転写活性への影響の検討

293T細胞を播種し, 翌日にpLTR-Luc 1 ng, pCMV-Renilla-luc 1 ngおよびpNFLAG-ZBRK1 (またはpNFLAG) 200 ng をLipofectamine2000 を用いてco-transfectionした. 48 時間後に細胞溶解液およびRNeasy Plus Mini Kitを用いてtotal RNAを抽出した. 細胞溶解液は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてLuciferase活性の定量を行った. Total RNAはReverTra Aceを用いてcDNAを合成し, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), primer (Luc; 5'-GAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTA-3', 5'-GAGGGATCTCTAGT TACCAGAG-3', β -actin; 5'-GTACCACTGGCATCGTGATGGACT-3', 5'-CCGCTCATTGCCAAT GGTGAT-3') を加えてStepOne RT-PCR system (Applied Biosystems) により mRNA発現量を定量した.

3) ZBRK-1 によるウイルス産生量および感染性への影響の検討

293T細胞を播種し, 翌日にpNL4-3 200 ngおよびpNFLAG-ZBRK1 (またはpNFLAG) 300 ng をLipofectamine2000 を用いてco-transfectionした. 48 時間後に培養上清および細胞溶解物を回収してルミパルス*f* (Fuji Rebio) を用いたCLEIA法によりp24 Gag抗原量を測定した. 培養上清をMAGI細胞 (HeLa細胞にCD4 およびCXCR4 を発現させ, HIV-1 LTRの下流にSV40 の核移行シグナルを付加した β -galactosidaseを挿入した発現ユニットを組み込んだ細胞) に感染させ, 48 時間後にMAGI assayによりウイルス感染価を測定した.

4) ZBRK1 によるクロマチンを介した LTR 転写活性への影響の検討

HeLa 細胞 LTR-Luc 安定発現株 (HeLa-LTR-Luc) を播種し, 翌日に Tat 発現プラスミド pCMV-Tat-V5 500 ngおよびpNFLAG-ZBRK1 (またはpNFLAG) 500 ng を co-transfection した. 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase Assay System (Promega) を用いて Luciferase 活性の定量を行い, Tat および ZBRK1 の発現を Western blotting により解析した.

第2項 結果および考察

ZBRK1 による HIV-1 LTR 転写活性への影響を検討するため、293T 細胞に LTR プロモーターから転写される Luciferase 発現プラスミド pLTR-Luc, pCMV-Renilla-Luc および FLAG-ZBRK-1 発現プラスミド pNFLAG-ZBRK1 (または empty plasmid) を co-transfection し、48 時間後に細胞溶解物を回収して Dual-Luciferase assay により Luciferase 活性を定量した。同様に total RNA を抽出して qRT-PCR により Luc mRNA 量を定量した。その結果、ZBRK1 の発現により Luciferase 活性および Luc mRNA 量が減少した (図 3-2)。

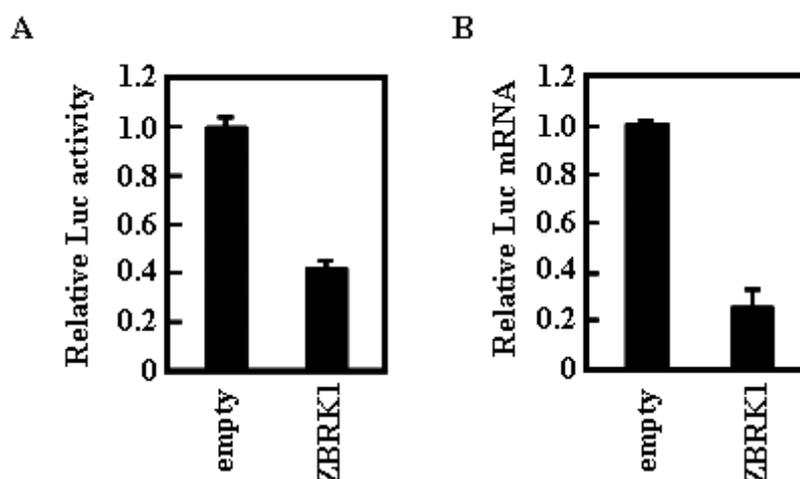


図 3-2 ZBRK-1 による HIV-1 LTR 転写活性への影響 (A) 293T 細胞に pLTR-Luc (1 ng), pCMV-Renilla-luc (1 ng) および pNFLAG または pNFLAG-ZBRK1 (200 ng) を co-transfection し、48 時間後に細胞溶解液を回収して Dual-Luciferase assay を行った。Luciferase 活性は Renilla luciferase 活性で標準化した。(B) 293T 細胞に pLTR-Luc (5 ng) および pNFLAG または pNFLAG-ZBRK1 (200 ng) を co-transfection し、total RNA を回収して qRT-PCR により Luc mRNA 量を定量した。Luc mRNA 量は β -actin mRNA 量で標準化した。

この結果より、ZBRK1 は HIV-1 LTR 転写活性を抑制することが明らかとなった。次に、ZBRK1 によるウイルス産生量および感染性への影響を検討するため、293T 細胞に HIV-1 プロウイルスプラスミド pNL4-3 および pNFLAG-ZBRK1 (または empty plasmid) を co-transfection し、48 時間後に培養上清および細胞溶解物を回収して CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した。また、培養上清を MAGI 細胞 (HeLa 細胞に CD4 および CXCR4 を発現させ、HIV-1 LTR の下流に SV40 の核移行シグナルを付加した β -galactosidase を挿入した発現ユニットを組み込んだ細胞) に感染させ、MAGI assay により感染性を検討した。その結果、ZBRK1 の発現により培養上清および細胞内の p24 Gag 抗原量が減少した (図 3-3 A)。さらに、ZBRK1 を発現させた細胞から産生されたウイルスは感染性の減少がみられた (図 3-3 B)。

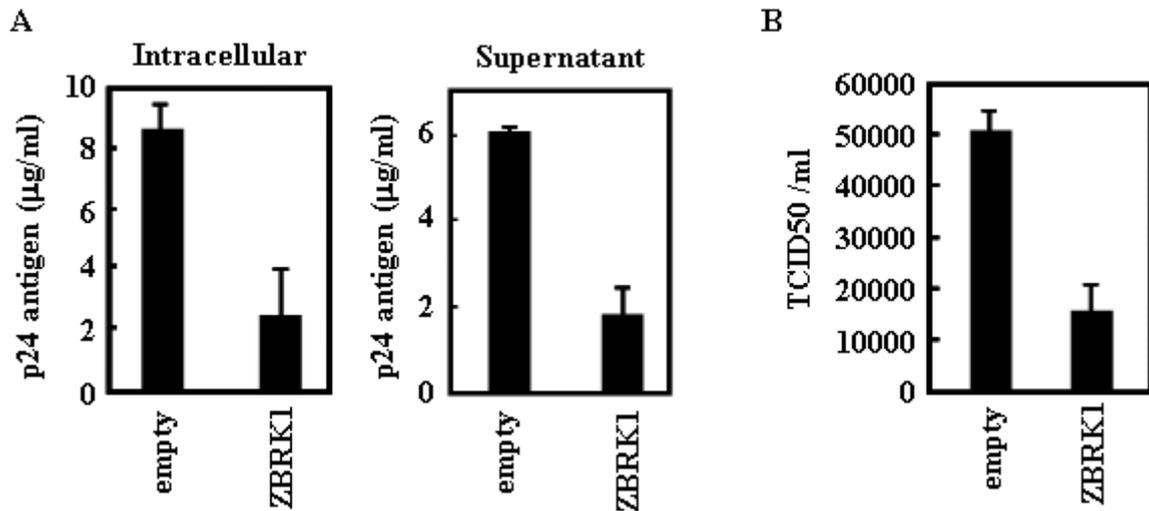


図 3-3 ZBRK-1 によるウイルス産生量および感染性への影響 (A) 293T 細胞に pNL4-3 (200 ng) および pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG (300 ng) を co-transfection し, 48 時間後に培養上清および細胞溶解物を回収して CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した. (B) MAGI 細胞に (A) の培養上清を感染させ, MAGI assay によりウイルス力価を測定した.

この結果より, ZBRK1 は LTR から転写される Luc のみならず, 全長 HIV-1 の転写をも抑制することが明らかとなった. さらに, ZBRK1 によるクロマチンを介した LTR の転写への影響を検討するため, HeLa 細胞 LTR-Luc 安定発現株 (HeLa-LTR-Luc) に Tat 発現プラスミド pCMV-Tat-V5 および pNFLAG-ZBRK1 (または empty plasmid) を co-transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase assay を行った. その結果, ZBRK1 は HeLa-LTR-Luc 安定発現株においても LTR 転写活性を抑制することがわかった (図 3-4 A).

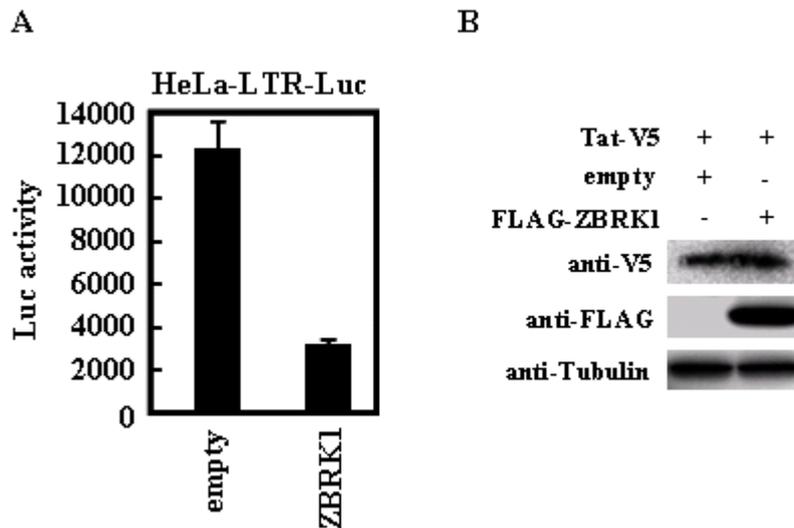


図 3-4 ZBRK1 によるクロマチンを介した LTR 転写活性への影響 (A) HeLa-LTR-Luc 細胞に pCMV-Tat-V5 (500 ng) および pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG (300 ng) を co-transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase assay を行った. (B) western blotting 法により (A) における Tat, ZBRK1 の発現を確認した.

以上の結果より, ZBRK1 が LTR から転写される Luc のみならず, 全長 HIV-1 の転写をも抑制することが明らかとなった. また, ZBRK1 が Tat によるクロマチンを介した LTR 転写活性化を抑制することがわかった. これらの事実より, ZBRK1 は潜伏感染プロウイルスの転写を抑制していると考えられる.

第3節 ZBRK1 の knock-down による HIV-1 複製の促進

第1項 実験方法

1) shRNA 発現レンチウイルスベクターの構築

pCS-U6-shControl または pCS-U6-shZBRK1 は Oligonucleotide (shControl; 5'-GATCCTTCTC CGAACGTGTCACGTTTCAAGAGAACGTGACACGTTTCGGAGAATTT-3', 5'-CTAGAAATTC TCCGAACGTGTCACGTTCTCTTCAAACGTGACACGTTTCGGAGAAG-3', shZBRK1; 5'-GAT CCGCAGAGAGGCACAGCTCATTATCAAGAGATAATGAGCTGTGCCTCTCTGCT-3', 5'-CTA GAGCAGAGAGGCACAGCTCATTATCTCTTGATAATGAGCTGTGCCTCTCTGCG-3') をアニーリングし, *Bam* HI および *Xba* I で制限酵素処理した pCS-U6 に Ligation high を用いて Ligation し, 構築を行った.

2) shRNA 発現レンチウイルスの作製

293T 細胞を播種し, 翌日に gag-pol 発現プラスミド (pMDLg/pRRE) 1.2 µg, rev 発現プラスミド (pRSV-Rev) 0.5 µg, VSV-G 発現プラスミド (pMD.G) 0.5 µg および pCS-U6-shControl または pCS-U6-shZBRK1 1.6 µg を Lipofectamine2000 を用いて co-transfection した. 48 時間後に培養上清を回収し 0.45 µm フィルターを通した.

3) ZBRK1 の knock-down による LTR 転写活性への影響

293T 細胞を播種し, 翌日に shRNA 発現レンチウイルス (CS-U6-shControl または CS-U6-shZBRK1) を感染させ, 48 時間後に pLTR-Luc 5 ng を Lipofectamine2000 を用いて transfection した. 48 時間後に細胞溶解液および RNeasy Plus Mini Kit を用いて total RNA を抽出した. 細胞溶解液は Luciferase Assay System を用いて Luciferase 活性の定量を行った. Total RNA は ReverTra Ace を用いて cDNA を合成し, SYBR Green PCR Master Mix, primer (ZBRK1; 5'-AGAAACAAGAGGCAGCCAAG-3', 5'-GGCTGTCCCACAAGGACTAC-3', β-actin; 5'-GTACCACTGGCATCGTGATGGACT-3', 5'-CCGCTCATTGCCAATGGTGAT-3') を加えて StepOne RT-PCR system により mRNA 発現量を定量した.

4) VSV-G pseudotyped NL-Luc の作製

293T 細胞を播種し, 翌日に *nef* の位置に luciferase を組み込んだ *env* 欠損 HIV-1 プロウイルスプラスミド (pNL-Luc) 1 µg および pMD.G 1 µg を Lipofectamine2000 を用いて co-transfection した. 48 時間後に培養上清を回収し 0.45 µm フィルターを通した.

5) ZBRK1 の knock-down によるプロウイルス転写活性への影響の検討

293T 細胞を播種し, 翌日に VSV-G pseudotyped NL-Luc を感染させ, 1 時間後に shRNA 発現レンチウイルス (CS-U6-shControl または CS-U6-shZBRK1) を感染させた. 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase Assay System を用いて Luciferase 活性の定量を行った.

6) NL4-3 の作製

293T 細胞を播種し, 翌日に pNL4-3 1 μ g を Lipofectamine2000 を用いて co-transfection した. 48 時間後に培養上清を回収し 0.45 μ m フィルターを通し, ルミパルス *f* を用いた CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した.

7) ZBRK1 の knock-down による HIV-1 複製への影響の検討

MT-4 細胞に shRNA 発現レンチウイルス (CS-U6-shControl または CS-U6-shZBRK1) を感染させ, 5 日後に NL4-3 (p24: 2 ng) を感染させた. 3 日毎に 9 日間培養上清を回収し, ルミパルス *f* を用いた CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した.

第2項 結果および考察

第2節では, ZBRK1 の発現が LTR 転写活性を抑制することを明らかにした. この事象の確実性をより高めるために, ZBRK1 の knock-down による LTR 転写活性への影響を検討した. 293T 細胞に ZBRK1 を標的とした shRNA (shZBRK1) またはコントロールの shRNA (shControl) 発現レンチウイルスを感染させ, 48 時間後に pLTR-Luc を transfection し, 48 時間後に total RNA を回収して qRT-PCR により ZBRK1 mRNA 量を定量した. 同様に細胞溶解物を回収して Luciferase assay を行った. その結果, shZBRK1 発現レンチウイルスの感染により ZBRK1 mRNA 量は減少し, それとは対照的に LTR 転写活性は上昇した (図 3-5 A,B).

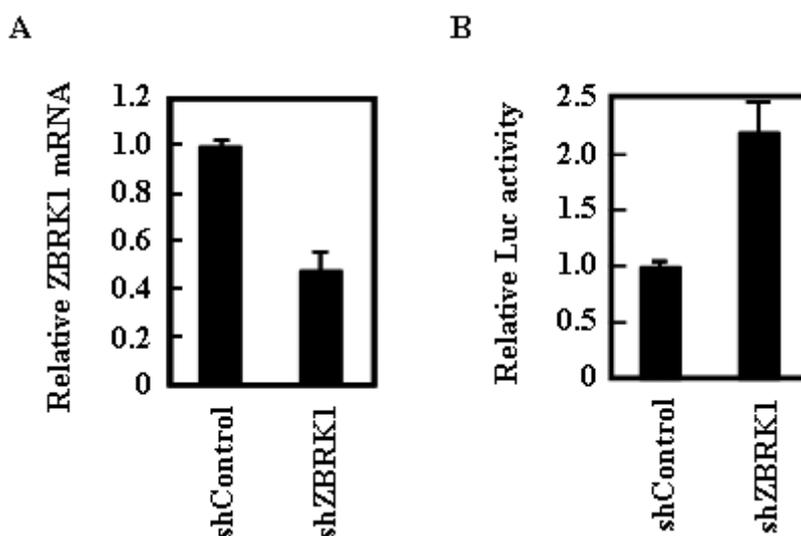


図 3-5 ZBRK1 の knock-down による LTR 転写活性への影響 (A) 293T 細胞に shZBRK1 または shControl 発現レンチウイルスを感染させ, 48 時間後に pLTR-Luc (5 ng) を transfection し, 48 時間後に total RNA を回収して qRT-PCR により ZBRK1 mRNA 量を定量した. ZBRK1 mRNA 量は β -actin mRNA で標準化した. (B) 293T 細胞に shZBRK1 または shControl 発現レンチウイルスを感染させ, 48 時間後に pLTR-Luc (5 ng) を transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase assay を行った.

これらの事実より、ZBRK1 が LTR 転写活性を抑制することをより明らかにすることができた。また、第 2 節の HeLa-LTR-Luc を用いた実験により ZBRK1 は潜伏感染プロウイルスの転写を抑制していることが示唆されたことから、ZBRK1 の knock-down による宿主染色体に組み込まれたプロウイルス転写活性への影響を検討した。293T 細胞に *nef* の位置に luciferase を組み込んだ *env* 欠損 HIV-1 プロウイルスプラスミド pNL-Luc および VSV-G 発現プラスミド pMD.G を co-transfection し、48 時間後に培養上清を回収して VSV-G pseudotyped NL-Luc を作製した。ここで得られた VSV-G pseudotyped NL-Luc を 293T 細胞に感染させ、1 時間後に shZBRK1 または shControl 発現レンチウイルスベクターを感染させて 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase assay を行った。その結果、ZBRK1 の knock-down により宿主染色体に組み込まれたプロウイルス転写活性が上昇したことから、ZBRK1 の knock-down は宿主染色体に組み込まれたプロウイルス転写活性を促進することが明らかとなった (図 3-6)。

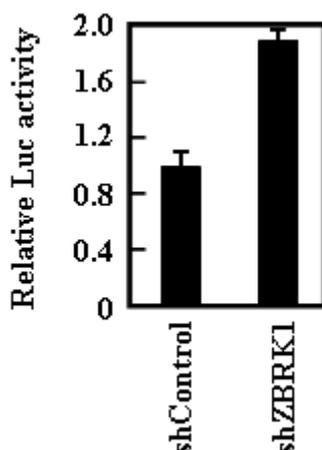


図 3-6 ZBRK1 の knock-down による宿主染色体に組み込まれたプロウイルス転写活性への影響 293T 細胞に VSV-G pseudotyped NL-Luc を感染させ、1 時間後に shZBRK1 または shControl 発現レンチウイルスベクターを感染させて 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase assay を行った。

つぎに、ZBRK1 の knock-down による HIV-1 複製への影響を検討した。T 細胞系の細胞株である MT-4 細胞に shZBRK1 または shControl 発現レンチウイルスベクターを感染させ、5 日後に NL4-3 を感染させて 3 日毎に 9 日間培養上清を回収し、CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定したところ、ZBRK1 の knock-down により 6,9 日後の培養上清中の p24 Gag 抗原量は 2 倍程度上昇した (図 3-7)。

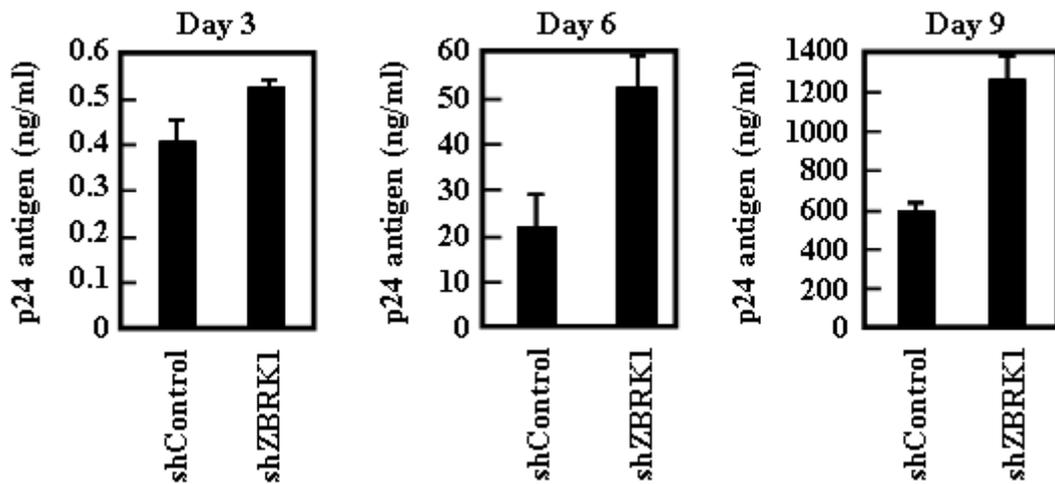


図 3-7 ZBRK1 の knock-down による HIV-1 複製への影響 MT-4 細胞に shZBRK1 または shControl 発現レンチウイルスベクターを感染させ、5 日後に NL4-3 (p24: 2ng) を感染させて 3 日毎に 9 日間培養上清を回収し、CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した。

以上の結果より, ZBRK1 の knock-down は LTR 転写活性を促進することを明らかにした. また, ZBRK1 の knock-down は宿主染色体に組み込まれたプロウイルス転写活性を促進することがわかった. さらに, ZBRK1 の knock-down による LTR 転写活性の上昇は HIV-1 複製を促進することを明らかにした. これらの事実, ZBRK1 は LTR 転写活性を抑制することで HIV-1 潜伏感染を制御することと考察される.

第4節 ZBRK1 の LTR 結合領域の同定

第1項 実験方法

1) LTR 欠損変異体 Luciferase 発現プラスミドの構築

pLTR-Lucを鋳型にprimer (-335 to +282; 5'-GACTCCATCCTGACCTTTGGATGGTGCTTC-3', 5'-TCAGACTAGTGCCCCTCGCCTCTTGCCGTG-3', -245 to +282; 5'-GACTGGATCCCTATGAGCCAGCATGGGATG-3', 5'-TCAGACTAGTGCCCCTCGCCTCTTGCCGTG-3', -106 to +282; 5'-GACTGGATCCAAGGGACTTTCCGCTGGGGA-3', 5'-TCAGACTAGTGCCCCTCGCCTCTTGCCGTG-3')を用いてKOD-plus-によりPCRを行った。PCR産物とpLTR-Lucを*Bam* HI および*Spe* Iにより制限酵素処理し, Ligation highを用いてpLTR (-335 to +282)-Luc, pLTR (-245 to +282)-Luc, pLTR (-106 to +282)-Lucの構築を行った。また, pLTR-Lucを鋳型にprimer (Δ NF- κ B; 5'-GCTTTCTACAATTTACTTTCCGCTTTTTACTTTCCAGGGAG-3', 5'-CTCCCTGAAAGTAAAAAGCGGAAAGTAAATTGTAGAAAGC-3', Δ Sp1; 5'-CCAGGGATTCGTGGCCTGTTCGGGACTGGTTAGTGGCG-3', 5'-CGCCACTAACCAGTCCCGAACAGGCCACGAATCCCTGG-3')を用いてKOD-Plus- Mutagenesis KitによりPCRを行い, pLTR Δ NF- κ B-LucおよびpLTR Δ Sp1-Lucの構築を行った。

2) ZBRK1によるLTR欠損変異体転写活性への影響の検討

293T細胞を播種し, 翌日にpLTR-LucもしくはLTR欠損変異体Luciferase発現プラスミド (pLTR (-335 to +282)-Luc, pLTR (-245 to +282)-Luc, pLTR (-106 to +282)-Luc, pLTR Δ NF- κ B-LucおよびpLTR Δ Sp1-Luc) 5 ng, pCMV-Renilla-luc 1 ngおよびpNFLAG-ZBRK1 (またはpNFLAG) 200 ng をLipofectamine2000を用いてco-transfectionした。48時間後に細胞溶解液を回収し, Dual-Luciferase Reporter Assay Systemを用いてLuciferase活性の定量を行った。

3) ZBRK1によるLTR転写抑制へのTatの影響の検討

293T細胞を播種し, 翌日にpLTR-Luc 5 ng, pCMV-Renilla-luc 1 ng, pCMV-Tat 100 ng, およびpNFLAG-ZBRK1 (またはpNFLAG) 200 ng をLipofectamine2000を用いてco-transfectionした。48時間後に細胞溶解液を回収し, Dual-Luciferase Reporter Assay Systemを用いてLuciferase活性の定量を行った。

第2項 結果および考察

第3節までに, ZBRK1はLTR転写活性を抑制することでHIV-1潜伏感染を制御することが示唆された。そこで, ZBRK1によるLTR転写活性の制御機構を解明するため, ZBRK1のLTR転写抑制に必要なLTR領域の同定を行った。LTRの転写因子活性に関与する領域はU3の上流に集中していることから, U3の上流を欠損させたLTR欠損変異体, NF- κ BまたはSp1結合部位を欠損させた5種類のLTR欠損変異体の下流にLuciferaseを挿入したプラ

スミドを作製した (図 3-8).

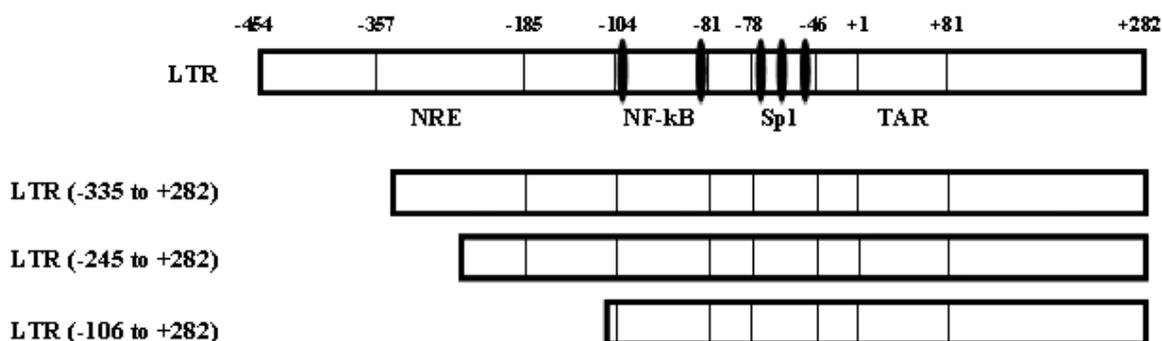


図 3-8 LTR 欠損変異体の構造 LTR の U3 上流からそれぞれ-336, -246, -107 までを欠損させた LTR 欠損変異体, NF-κB または Sp1 結合部位を欠損させた 5 種類の LTR 欠損変異体の下流に Luciferase を挿入したプラスミドを作製した.

293T 細胞に pLTR-Luc または U3 上流から-336, -246, -107 までを欠損させた LTR 欠損変異体プラスミド, pCMV-Renilla-Luc および pNFLAG-ZBRK1 (または empty plasmid) を co-transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Dual-Luciferase assay を行った. その結果, LTR (-335 to +282) および LTR (-245 to +282) では ZBRK1 による LTR 転写活性抑制に影響はみられなかった. しかし, LTR (-106 to +282) では ZBRK1 による LTR 転写活性抑制が解除された (図 3-9).

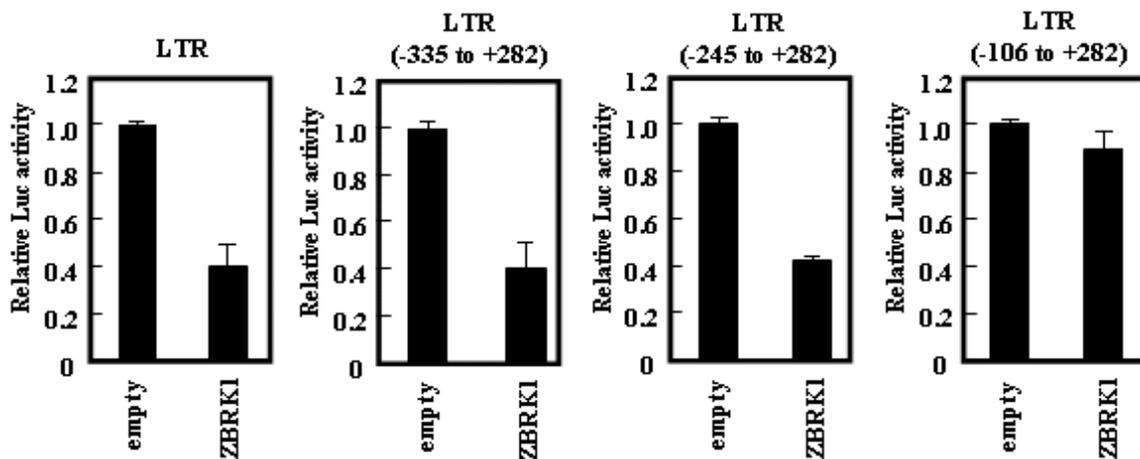


図 3-9 ZBRK1 による LTR 転写抑制に必要な LTR 領域の同定 293T 細胞に pLTR-Luc または U3 上流から-336, -246, -107 までを欠損させた LTR 欠損変異体プラスミド (5 ng), pCMV-Renilla-luc (1 ng) および pNFLAG または pNFLAG-ZBRK1 (200 ng) を co-transfection し, 48 時間後に培養上清を回収して Dual-Luciferase assay を行った.

LTR の転写活性制御において NF- κ B と Sp-1 は特に重要な転写活性化因子である. そこで, LTR の NF- κ B または Sp1 結合部位を欠損させた LTR 欠損変異体への ZBRK1 の影響を検討した. 293T 細胞に NF- κ B または Sp1 結合部位を欠損させた LTR 欠損変異体プラスミド, pCMV-Renilla-Luc および pNFLAG-ZBRK1 (または empty plasmid) を co-transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Dual-Luciferase assay を行った. その結果, Sp-1 および NF- κ B 結合部位を欠損させても ZBRK1 による LTR 転写抑制には影響はみられなかった (図 3-10).

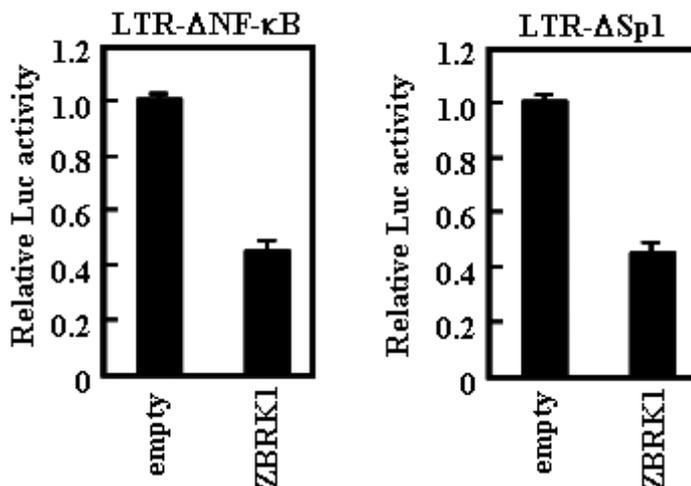


図 3-10 ZBRK1 による LTR 転写抑制への NF κ B および Sp-1 の影響 293T 細胞に NF- κ B または Sp1 結合部位を欠損させた LTR 欠損変異体プラスミド (5 ng), pCMV-Renilla-luc (1 ng) および pNFLAG または pNFLAG-ZBRK1 (200 ng) を co-transfection し, 48 時間後に培養上清を回収して Dual-Luciferase assay を行った.

さらに, Tat の LTR 転写活性化への ZBRK1 の影響を検討するため, 293T 細胞に pLTR-Luc, pCMV-Renilla-luc, pCMV-Tat-V5 および pNFLAG または pNFLAG-ZBRK1 を co-transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Dual-Luciferase assay を行った. その結果, Tat を発現させても ZBRK1 による LTR 転写抑制には影響はみられなかった (図 3-11).

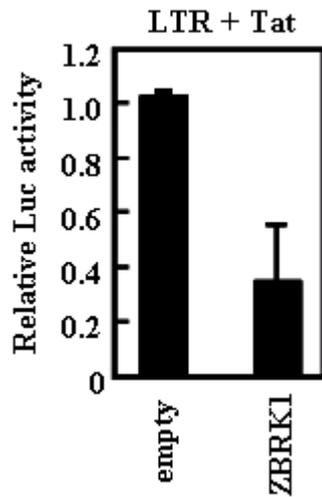


図 3-11 ZBRK1 による LTR 転写抑制への Tat の影響 293T 細胞に pLTR-Luc (5 ng), pCMV-Renilla-luc (1 ng), pCMV-Tat-V5 (100 ng) および pNFLAG または pNFLAG-ZBRK1 (200 ng) を co-transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Dual-Luciferase assay を行った.

これらの結果より, ZBRK1 の Zinc finger motif は LTR の (-245)-(-107) の領域に結合することが示唆された. さらに, ZBRK1 による LTR 転写制御は転写活性化因子 NF- κ B および Sp-1 や Tat の影響を受けないことから, これらの転写活性化因子とは独立して直接 LTR 転写活性を抑制することが明らかとなった.

第5節 ZBRK1 による LTR 転写抑制機構の解明

第1項 実験方法

1) ZBRK1-DV12,13AA 変異体発現プラスミドの構築

pNFLAG-ZBRK1 を鋳型に primer (5'-CATAACACTGGAGGCTGCGGCTGTGGACTT-3', 5'-AAGTCCACAGCCGCAGCCTCCAGTGTTATG-3') を用いて KOD-Plus- Mutagenesis Kit により PCR を行い, pNFLAG-ZBRK1-DV12,13AA の構築を行った。

2) ZBRK1 と TRIM28 の相互作用解析

293T 細胞を播種し, 翌日に pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG-ZBRK1-DV12,13AA 500 ng を Lipofectamine2000 を用いて transfection した。48 時間後に細胞溶解液を回収し, anti-FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich) および Dynabeads Protein G を用いて免疫沈降を行った。共免疫沈降物を anti-Trim28 抗体 (GeneTex) を用いた Western blotting により解析した。

3) ZBRK1 による LTR 転写抑制における TRIM28 の影響の検討

293T 細胞を播種し, 翌日に pLTR-Luc 5 ng, pCMV-Renilla-luc 1 ng および pNFLAG-ZBRK1 (または pNFLAG-ZBRK1-DV12,13A または pNFLAG) 200 ng を Lipofectamine2000 を用いて co-transfection した。48 時間後に細胞溶解液を回収し, Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて Luciferase 活性の定量を行った。

4) ZBRK1 による LTR 転写抑制における HDAC 活性の影響の検討

HeLa-LTR-Luc 細胞を播種し, 翌日に pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG 500 ng を Lipofectamine2000 を用いて transfection した。24 時間後に終濃度 0, 80, 400 nM となるように Trichostatin A を添加し, 24 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase Assay System を用いて Luciferase 活性の定量を行った。

5) ZBRK1 による LTR 転写抑制における HDAC1 および HDAC2 の影響の検討

HeLa-LTR-Luc 細胞を播種し, 翌日に終濃度 70 nM の Control siRNA (siControl; Santa cruz), HDAC1 に対する siRNA (siHDAC1; Santa cruz) または HDAC2 に対する siRNA (siHDAC2; Santa cruz) を Lipofectamine2000 を用いて transfection した。24 時間後に pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG 500 ng を Lipofectamine2000 を用いて transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase Assay System を用いて Luciferase 活性の定量を行った。

第2項 結果および考察

転写制御にはヒストンの修飾が重要な機能を果たしており, ヒストンのアセチル化により転写は正に制御され, ヒストンの脱アセチル化およびメチル化により転写は負に制御されることが知られている。そこで, ZBRK1 による LTR 転写抑制機構にヒストンの修飾がど

のように関係しているかを検討した。

まず、KRAB-ZNF の転写制御において重要な機能を果たす TRIM28 との結合が ZBRK1 による LTR 転写抑制に影響を及ぼすかを検討した。293T 細胞に pNFLAG-ZBRK1 または ZBRK1 の TRIM28 との結合部位である KRAB domain に変異を入れた変異体発現プラスミド pNFLAG-ZBRK-1DV12,13AA を transfection し, anti-FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により相互作用解析を行った。その結果, ZBRK1 は TRIM28 との相互作用が認められたが, ZBRK-1DV12,13AA は TRIM28 との相互作用が認められなかった (図 3-12 A)。さらに, TRIM28 と ZBRK1 の相互作用が ZBRK1 による LTR 転写抑制に及ぼす影響を検討するため, 293T 細胞に pLTR-Luc , pCMV-Renilla-Luc および pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG-ZBRK-1DV12,13AA を, co-transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Dual-Luciferase assay を行った。その結果, ZBRK-1DV12,13AA は ZBRK1 による LTR 転写抑制が解除された (図 3-12 B)。

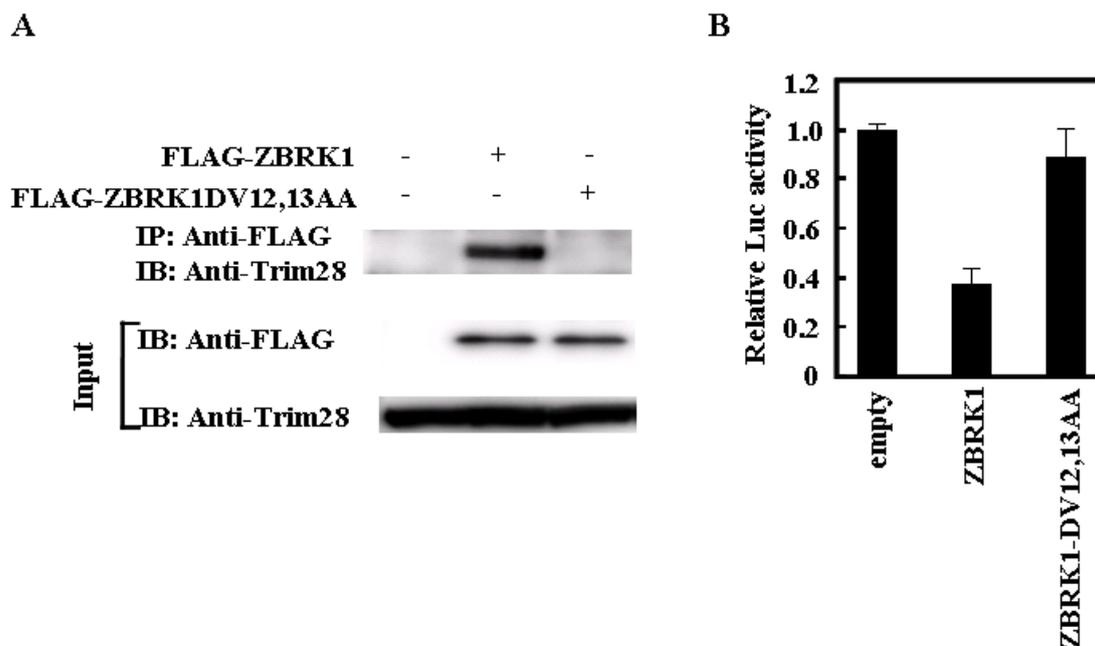


図 3-12 ZBRK1 による LTR 転写抑制における TRIM28 の影響 (A) 293T 細胞に pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG-ZBRK1-DV12,13AA (500 ng) を transfection した。48 時間後に細胞溶解液を回収し, anti-FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich) を用いて免疫沈降を行った。(B) 293T 細胞に pLTR-Luc (5 ng), pCMV-Renilla-luc (1 ng) および pNFLAG-ZBRK1, pNFLAG-ZBRK1-DV12,13A または pNFLAG (200 ng) を co-transfection した。48 時間後に細胞溶解液を回収し, Dual-Luciferase assay を行った。

この結果より, ZBRK1 による LTR 転写抑制には TRIM28 との相互作用が必要であることが明らかとなった。次に, ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC の影響を検討するため,

HeLa-LTR-Luc 細胞に pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG を transfection した. 24 時間後に HDAC 阻害剤である Trichostatin A を添加し, さらに 24 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase assay を行ったところ, Trichostatin A 400 nM の添加時に ZBRK1 による LTR 転写抑制は解除された (図 3-13).

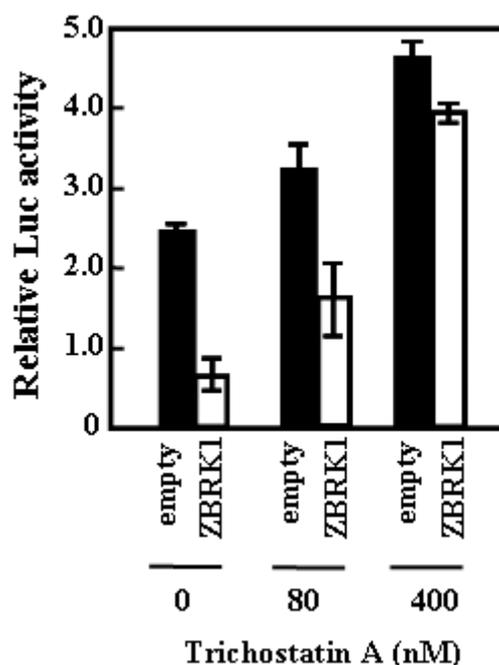


図 3-13 ZBRK1 による LTR 転写抑制における HDAC 活性の影響 HeLa-LTR-Luc 細胞に pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG (500 ng) を transfection した. 24 時間後に終濃度 0, 80, 400 nM となるように Trichostatin A を添加し, 24 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase Assay を行った.

この結果より ZBRK1 による LTR 転写抑制には HDAC 活性が必要であることが明らかとなった. ZBRK1 はヒストンを脱アセチル化することにより転写を抑制していることが示唆された. HDAC family には, 現在 HDAC1-11 の 11 種類が同定されている. そこで, ZBRK1 による LTR 転写抑制にどの HDAC が関与しているかを検討するために, HeLa-LTR-Luc 細胞に pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG および siHDAC1, siHDAC2 を co-transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase assay を行ったところ, HDAC2 の knock-down において ZBRK1 による LTR 転写抑制は解除された (図 3-14).

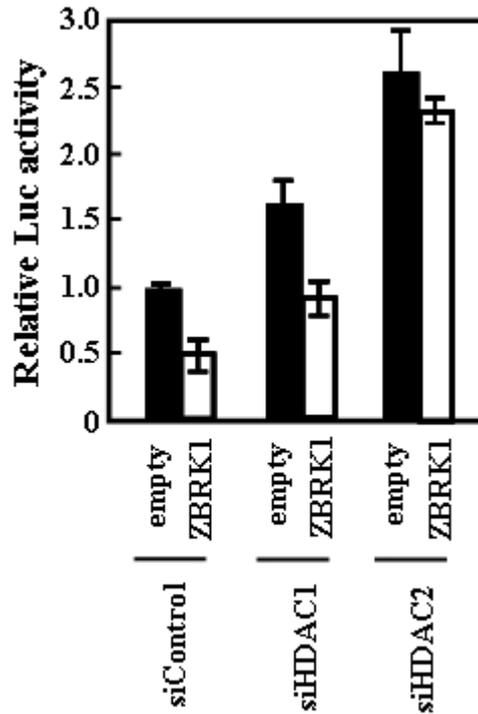


図 3-14 ZBRK1 による LTR 転写抑制における HDAC1 および HDAC2 の影響 HeLa-LTR-Luc 細胞に終濃度 70 nM の siControl, siHDAC1 または siHDAC2 を transfection した. 24 時間後に pNFLAG-ZBRK1 または pNFLAG (500 ng) を transfection し, 48 時間後に細胞溶解物を回収して Luciferase Assay を行った.

これらの結果より, ZBRK1 による LTR 転写抑制には TRIM28 との相互作用および HDAC2 によるヒストン脱アセチル化が必須因子であることが明らかとなった.

第6節 まとめ

第2節では、ZBRK1がLTRから転写されるLucのみならず、全長HIV-1の転写をも抑制することが明らかとなった。また、ZBRK1がTatによるクロマチンを介したLTR転写活性化を抑制することがわかった。第3節ではZBRK1のknock-downがLTR転写活性を促進すること、LTR転写活性の上昇はHIV-1複製を促進することを明らかにした。また、ZBRK1のknock-downは宿主染色体に組み込まれたプロウイルス転写活性を促進することがわかった。このことから、ZBRK1はLTR転写活性を抑制することでHIV-1潜伏感染を制御することが示唆された。第4節では、ZBRK1のZinc finger motifはLTRの(-245)-(-107)の領域に結合することが示唆された。さらに、ZBRK1によるLTR転写制御は転写活性化因子NF- κ BおよびSp-1やTatの影響を受けないことから、これらの転写活性化因子とは独立して直接LTR転写活性を抑制することが明らかとなった。第5節ではZBRK1によるLTR転写抑制にはTRIM28との相互作用およびHDAC2によるヒストン脱アセチル化が必須因子であることをつきとめた。

以上の結果より、ZBRK1によるヒストンの脱アセチル化はプロウイルスのLTR転写活性を抑制し、HIV-1の潜伏感染を制御する一因となることを見出した(図3-15)。

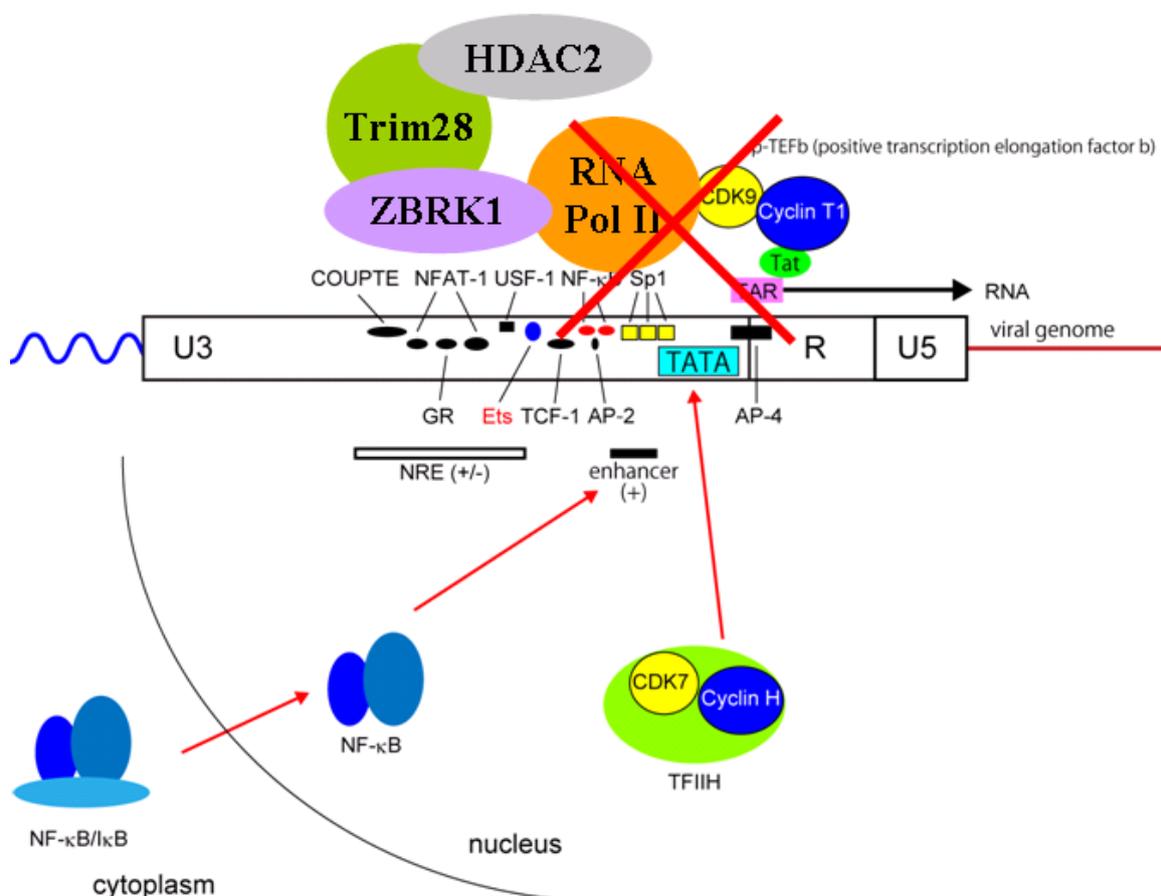


図 3-15 ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染制御機構

第4章 PGA1 を用いた APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製の制御

第1節 はじめに

APOBEC3G は HIV-1 複製を負に制御する宿主因子であり，HIV-1 粒子に取り込まれることで HIV-1 複製を強力に抑制する．しかし，HIV-1 は APOBEC3G を分解する Vif をコードしている．我々は，これまでに多様な機能を有する分子シャペロン的一种である Heat shock protein 70 (Hsp70) が Vif と APOBEC3G の結合を阻害することで Vif による APOBEC3G 分解を抑制し，さらに HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みを促進することを報告した (図 4-1)．

そこで，Hsp70 の転写因子である HSF1 を活性化し，Hsp70 発現を誘導する Prostaglandin A1 (PGA1; 図 4-2) が新たな HIV-1 治療薬の開発につながるのではないかと仮説の基，HIV-1 複製への影響を検討した．

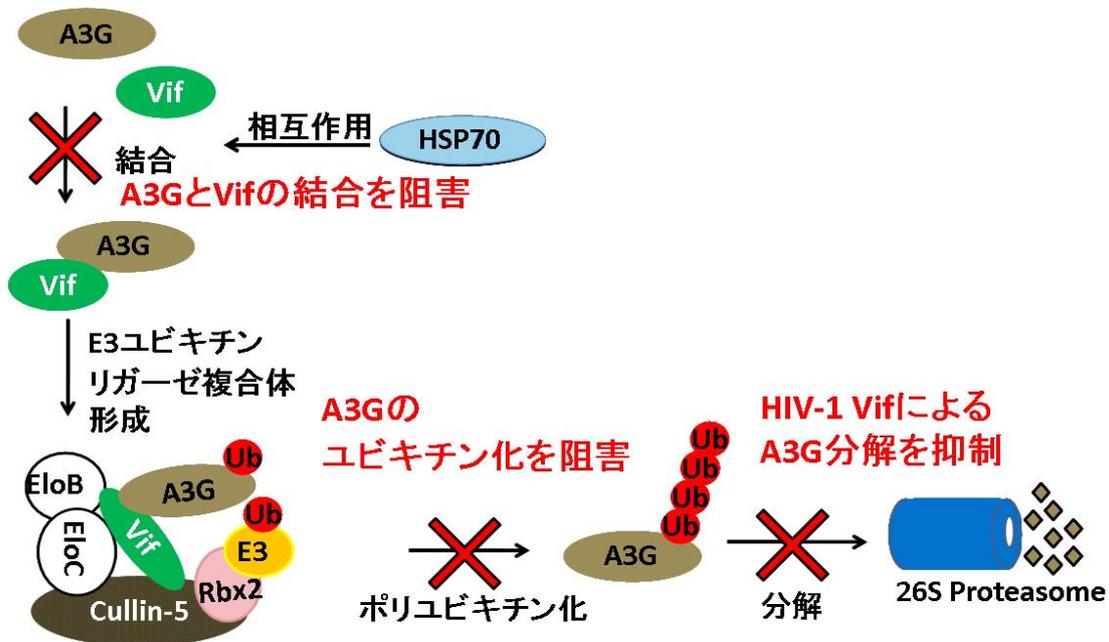


図 4-1 Hsp70 による APOBEC3G 分解抑制機構

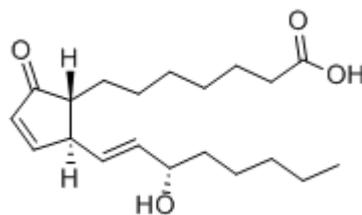


図 4-2 PGA1 の分子構造

第2節 PGA1によるHsp70誘導はAPOBEC3G依存的にHIV-1感染性を抑制

第1項 実験方法

1) PGA1によるウイルス粒子へのAPOBEC3Gの取り込みへの影響の検討

293T細胞を播種し、翌日に終濃度4 µg/mlとなるようにPGA1を添加し、4時間後にpNL4-3またはVif欠損プロウイルス発現プラスミドであるpNL4-3ΔVif 100 ng, HAタグを付加したAPOBEC3G発現プラスミドpcDNA-APOBEC3G-HAまたはpcDNA3.1 1 µgをLipofectamine2000を用いてco-transfectionした。48時間後に培養上清および細胞溶解液を回収した。培養上清はルミパルス法を用いたCLEIA法によりp24 Gag抗原量を測定した。培養上清および細胞溶解液を用いてwestern blotting法により細胞内のAPOBEC3Gの発現およびHIV-1粒子内へのAPOBEC3Gの取り込みを確認した。

2) PGA1によるHIV-1感染性への影響の検討

1)の培養上清をp24: 5 ngでMAGI細胞に感染させ、48時間後にMAGI assayによりウイルス感染価を測定した。

第2項 結果および考察

まず、PGA1によるHIV-1感染性とウイルス粒子へのAPOBEC3Gの取り込みへの影響を検討した。293T細胞にPGA1を添加し、4時間後にpNL4-3(またはpNL4-3ΔVif)およびpcDNA-APOBEC3G-HA(またはpcDNA3.1)をco-transfectionし、48時間後に細胞溶解物および培養上清を回収し、western blotting法により細胞内のAPOBEC3Gの発現およびHIV-1粒子内へのAPOBEC3Gの取り込みを確認した。細胞内のHsp70発現を検討した結果、PGA1添加によりHsp70の発現が増加していた(図4-3A)。さらに、HIV-1粒子内へのAPOBEC3Gの取り込みを検討した結果、pNL4-3ではHsp70発現量依存的にHIV-1粒子へのAPOBEC3Gの取り込みが増加していた。これは細胞内のVifによるAPOBEC3Gの分解がHsp70により抑制されたためであると考察される。一方、pNL4-3ΔVifにおいてもHsp70発現量依存的にHIV-1粒子へのAPOBEC3Gの取り込みが増加していた(図4-3B)。

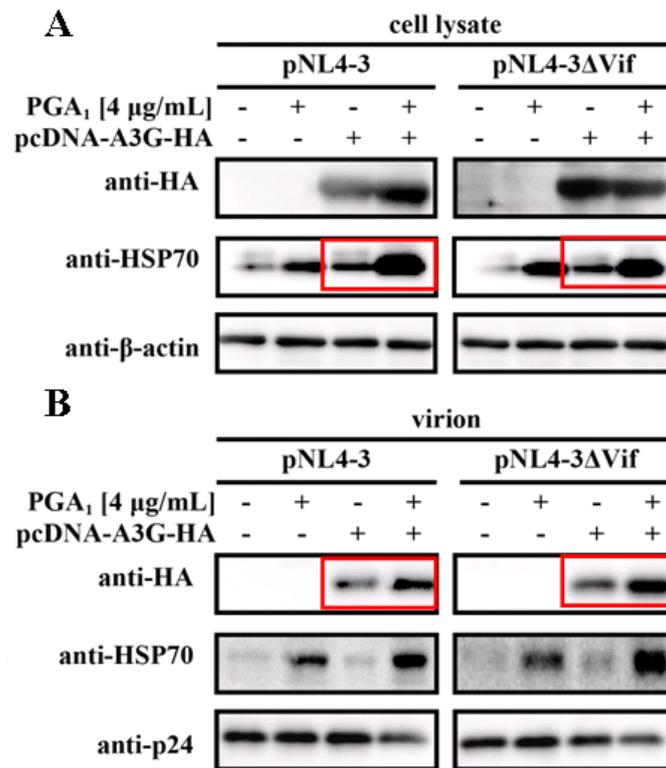


図 4-3 PGA1 によるウイルス粒子への APOBEC3G の取り込みへの影響 293T 細胞に終濃度 4 μg/ml となるように PGA1 を添加し、4 時間後に pNL4-3 または pNL4-3ΔVif (100 ng), pcDNA-APOBEC3G-HA または pcDNA3.1 (1 μg) を co-transfection した。48 時間後に培養上清および細胞溶解液を回収した。培養上清および細胞溶解液を用いて western blotting 法により細胞内の APOBEC3G の発現 (A) および HIV-1 粒子内への APOBEC3G の取り込み (B) を確認した。

次に、作製した HIV-1 の感染性を MAGI assay により検討した。その結果、APOBEC3G 発現下において作製された HIV-1 は PGA1 の添加により感染性が抑制された (図 4-4)。この結果は、HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込み量に相関していることから、PGA1 による Hsp70 発現の誘導は APOBEC3G 依存的に HIV-1 の感染性を抑制することが示された。

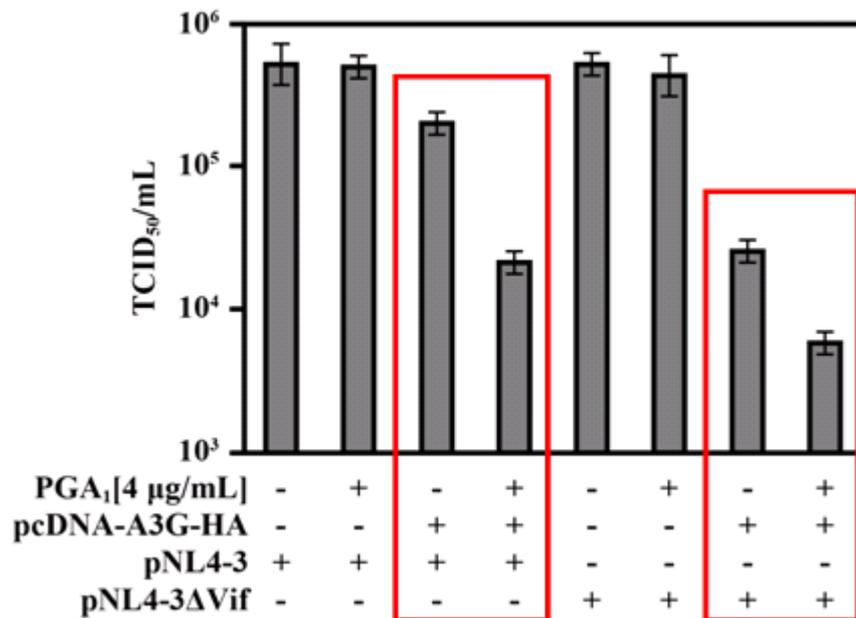


図 4-4 PGA₁ による HIV-1 感染性への影響 図 4-3 の培養上清を p24: 5 ng で MAGI 細胞に感染させ、48 時間後に MAGI assay によりウイルス感染価を測定した。

以上の結果より、PGA₁ の添加は Hsp70 発現を誘導し、Vif による APOBEC3G の分解を抑制することによりウイルス粒子への APOBEC3G の取り込みを促進させ、ウイルス感染性を抑制することを明らかにした。

第3節 PGA1 を用いた内在性 APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製抑制

第1項 実験方法

1) PGA1 による内在性 APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製への影響の検討

T 細胞系の H9 細胞に NL4-3 (p24: 5 ng) を感染させて 4 時間後にウイルスを洗い流し, 終濃度 4 $\mu\text{g/ml}$ となるように PGA1 を添加して 2 日間培養した. 2 日後に再度 PGA1 を添加し, さらに 2 日間培養した. 細胞溶解物および培養上清を回収し, 細胞溶解物は western blotting 法により APOBEC3G の発現を確認した. 培養上清はルミパルス *f* を用いた CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した.

2) PGA1 による 14 日間での内在性 APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製への影響の検討

H9 細胞および同じく内在的に APOBEC3G を発現している T 細胞系の CEM 細胞に NL4-3 (p24: 5 ng) を感染させて 4 時間後にウイルスを洗い流し, PGA1 を添加して 2 日間培養した. その後, 14 日間にわたって 2 日毎に培養上清を回収して PGA1 を添加した. 培養上清はルミパルス *f* を用いた CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した.

第2項 結果および考察

第 2 節では, 293T 細胞にプラスミドを用いて強制発現させた APOBEC3G への PGA1 の効果を検討したが, 内在性の APOBEC3G に対して効果が認められなければ HIV-1 治療薬としての有用性を示すことはできない. そこで, 内在的に APOBEC3G を発現している T 細胞系の H9 細胞における PGA1 による HIV-1 複製への影響を検討した. H9 細胞に NL4-3 (p24: 5 ng) を感染させて 4 時間後にウイルスを洗い流し, PGA1 を添加して 2 日間培養した. 2 日後に再度 PGA1 を添加し, さらに 2 日間培養した. NL4-3 感染 4 日後に細胞溶解物および培養上清を回収し, 細胞溶解物は western blotting 法により APOBEC3G の発現を確認した. 培養上清は CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した. その結果, PGA1 の 2 回添加および 1 回添加は培養上清の p24 Gag 抗原量が著しく減少した (図 4-5 A). さらに, 細胞内の Hsp70 および APOBEC3G の発現量も PGA1 の 2 回添加および 1 回添加により上昇していた (図 4-5 B). このことから, PGA1 は 1 回の添加で内在性の APOBEC3G に対して効果を示し, HIV-1 複製を顕著に抑制することが明らかとなった.

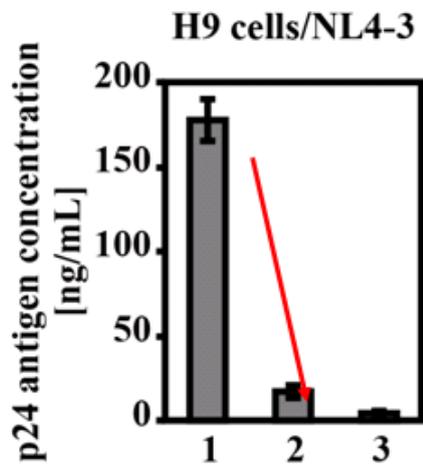
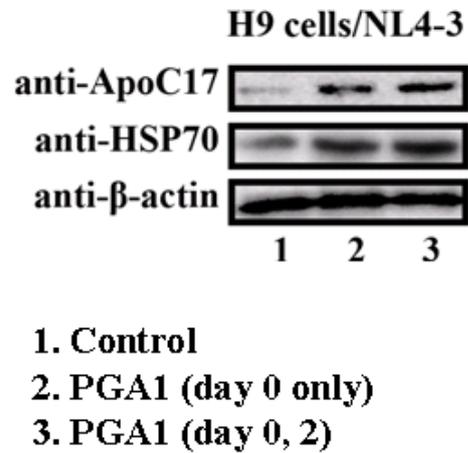
A**B**

図 4-4 PGA1 による内在性 APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製への影響 H9 細胞に NL4-3 (p24: 5 ng) を感染させて 4 時間後にウイルスを洗い流し, 終濃度 4 $\mu\text{g/ml}$ となるように PGA1 を添加して 2 日間培養した. 2 日後に再度 PGA1 を添加し, さらに 2 日間培養した. 細胞溶解物および培養上清を回収し, 培養上清はルミパルス *f* を用いた CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した (A). 細胞溶解物は western blotting 法により APOBEC3G の発現を確認した (B).

次に, PGA1 の添加は 1 回のみで顕著に HIV-1 複製を抑制することが明らかとなったため, この効果がどの程度の期間持続するか, H9 細胞以外の細胞でも同様の効果がみられるかを検討するため, H9 細胞および同じく内在的に APOBEC3G を発現している T 細胞系の CEM 細胞を用いて PGA1 による HIV-1 複製への影響を検討した. H9 細胞および CEM 細胞に NL4-3 (p24: 5 ng) を感染させて 4 時間後にウイルスを洗い流し, PGA1 を添加して 2 日間培養した. その後, 14 日間にわたって 2 日毎に培養上清を回収して PGA1 を添加した. 培養上清は CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した. その結果, PGA1 の毎回添加では p24 Gag 産生量の上昇は全く認められず, PGA1 の 1 回添加では 14 日後でコントロールと比較して H9 細胞, CEM 細胞ともに 20%程度の p24 Gag 産生量であった (図 4-6).

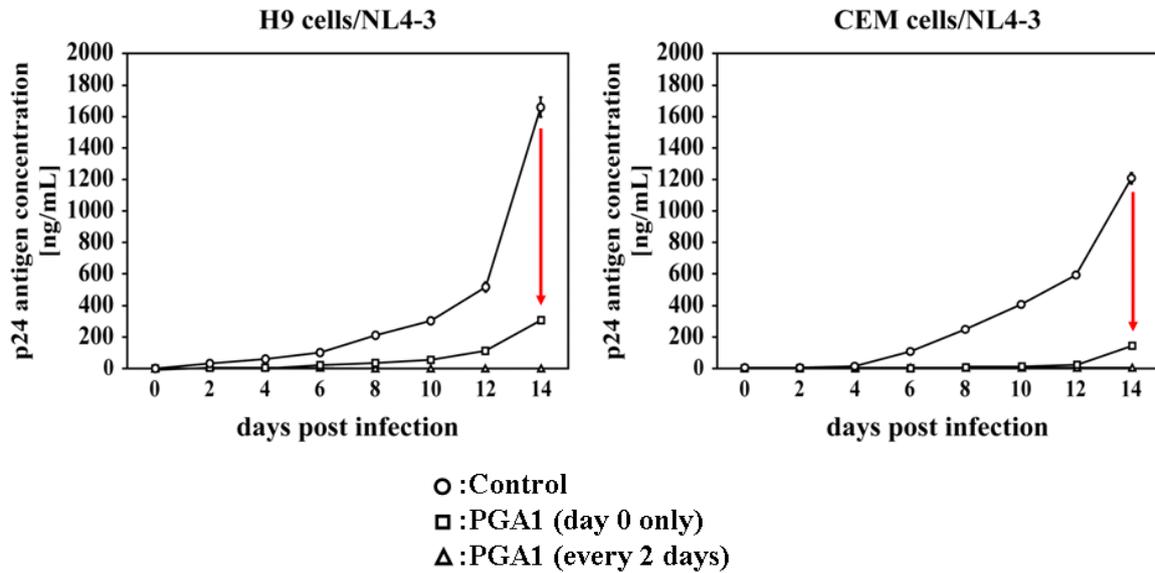


図 4-5 PGA1 による 14 日間での内在性 APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製への影響 H9 細胞および CEM 細胞に NL4-3 (p24: 5 ng) を感染させて 4 時間後にウイルスを洗い流し, PGA1 を添加して 2 日間培養した. その後, 14 日間にわたって 2 日毎に培養上清を回収して PGA1 を添加した. 培養上清はルミパルス f を用いた CLEIA 法により p24 Gag 抗原量を測定した.

以上の結果より, H9 細胞および CEM 細胞ともに PGA1 は効果的に HIV-1 複製を抑制することから, PGA1 は新規 HIV-1 治療薬として有効な低分子化合物であることが明らかとなった.

第4節 まとめ

PGA1 による Hsp70 発現の誘導は, APOBEC3G の分解を抑制し, ウイルス粒子への APOBEC3G の取り込みを上昇させることで感染性が抑制することを明らかにした. さらに, PGA1 により内在性の APOBEC3G に対しても分解の抑制がみられ, 1 回の添加で 14 日間以上にわたり HIV-1 複製を抑制した. このことから, Hsp70 の発現誘導は HIV-1 増殖・複製を効果的に抑制できることが示唆された. また, Hsp70 は宿主内在性の因子であることから, Hsp70 の発現による副作用は考えにくく, さらに本研究で明らかにした HIV-1 増殖・複製抑制機構は既存薬剤の作用点とも異なることから, Hsp70 発現を誘導する低分子化合物 PGA1 は新たな HIV-1 治療薬として期待される.

4. 実験

4.1. 試薬および器具

Elix-UV 3 (Millipore Co., MA., USA)
Milli-Q Academic (Millipore Co., MA., USA)
CENTRIFUGE, MICRO 6 (ASAHI TECHNOGLASS Co., Ltd., Tokyo, Japan)
VOLTEX-2 GENIE (SCIENTIFIC Industries, Inc., N.Y., USA)
pH Meter (TOA Electronics Ltd., Tokyo, Japan)
E.Coli Pulser (Bio-Rad Laboratories Inc, CA., USA)
Bio-Rad E.Coli Pulser Compatible Cuvette (BM Equipment Co., Ltd., Tokyo, Japan)
FAS-II (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan)
Mupid II (Advance Co., Ltd., Tokyo, Japan)
Nano Drop (Hitachi Instruments Service Co., Ltd., Tokyo, Japan)
Millex-HA 0.45 μm Filter (Millipore S. A., Molsheim, France)
Millex-HA 0.22 μm Filter (Millipore S. A., Molsheim, France)
Tissue Culture Flask (Griner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Germany)
Tissue Culture Dish (Griner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Germany)
CO₂ Multi Gus Incubator (Showa Astec Co., Ltd., Tokyo, Japan)
Etanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
2-Propanol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
Disodium Dihydrogen Ethylene Diamine Tetraacetate Dihydrate (EDTA-2Na) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
Bacto tryptone (SIGMA-ALDRICH Co., MO., USA)
Bacto yeast extract (SIGMA-ALDRICH Co., MO., USA)
Bacto agar (Funakoshi Co., Ltd., Tokyo, Japan)
Ampicillin Sodium (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
Ribonuclease A (RNase A) (SIGMA-ALDRICH Co., MO., USA)
JET star 2.0 Plasmid Maxiprep Kit (Genomed Inc., CA., USA)
XL-II Blue (STRATAGENE, CA., USA)
Eco RI (New England Biolabs, Inc., MA., USA)
*Bam*H I (New England Biolabs, Inc., MA., USA)
*Eco*R I (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan)
Ligation high (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan)
Agarose S (Bio Chain Institute, Inc., Tokyo, Japan)

Etidium Bromide (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
Paraffin liquid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
Gene Elute Mammalian total RNA purification kit (SIGMA-ALDRICH Co., MO., USA)
RT-PCR high -plus- (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan)
RNase Inhibitor (TOYOBO Co., Ltd., Osaka, Japan)
100 bp DNA Ladder (New England Biolabs, Inc., MA., USA)
1 kb DNA Ladder (New England Biolabs, Inc., MA., USA)
Potassium Dihydrogenphosphate (KH_2PO_4) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
Disodium Hydroxyphosphate 12-Water ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
Potassium Chloride (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)
Trypsine-EDTA (DENKA SEIKEN Co., Ltd., Tokyo, Japan)
Fetal Bovine Serum (FBS) (SIGMA-ALDRICH Co., MO., USA)
Penicillin/ Streptomycin (Life Technologies Inc., MD., USA)
Trypan Blue Stain (Life Technologies Inc., MD., USA)
FuGENETM6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 Medium (SIGMA-ALDRICH Co., MO., USA)
Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (PIERCE, IL., USA)
Lipofectamine2000 (Invitrogene Corp., Carlsbad, CA., USA)
Dynabeads Protein G (Invitrogene Corp., Carlsbad, CA., USA)
HIV p24 検体処理液 (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan)
検体希釈液 (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan)
HIV p24 免疫カートリッジ (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan)
基質液 (Fujirebio Inc., Tokyo, Japan)

4.2. 試薬調製

- 蒸留水 (RO 水)

純水装置を用いて、半透膜に浸透圧以上の圧力を逆向きに向け、水分子のみを通すことにより精製した。原水中の無機イオンの 95%以上、コロイド物質、バクテリア、有機物の 99%以上を除去した。比抵抗値 $3 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の水。
- 超純水 (Milli-Q 水)

超純水装置を用いて、イオン交換樹脂に複数回通し、さらに限外濾過膜に通すことにより原水中のイオン化合物を除去した。比抵抗値 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ (25°C 時) 以上の水。
- 滅菌水 (sH₂O)

Milli-Q 水を 121°C, 20 min オートクレーブ滅菌した。
- 2×YT medium

Bacto tryptone (3.2 g), Bacto yeast extract (2 g), NaCl (1 g) を RO 水 (200 mL) に溶解して、121°C, 20 min オートクレーブ滅菌した。
- Ampicillin 保存溶液 (100 mg/mL)

Ampicillin Sodium (1 g) を sH₂O (10 mL) に溶解して、0.22 μm Filter で濾過滅菌した後、1 mL ずつ分注し、-20°C にて保存した。
- LB/Amp plate

LB agar (16.5 g) を RO 水 (500 mL) に溶解して、121°C, 20 min オートクレーブ滅菌した。50~60°C に冷却して、Ampicillin 保存溶液 500 μL を加えた後、滅菌シャーレに適量を分注して冷やし固め、4°C にて保存した。
- 1M Tris-HCl (pH 8.0)

Tris (12.1 g) を Milli-Q 水 (80 mL) に溶解して、HCl 溶液で pH 8.0 に調整した後、Milli-Q 水で 100 mL にメスアップした後、121°C, 20 min オートクレーブ滅菌した。
- 0.5M EDTA (pH 8.0)

EDTA-2Na (18.6 g) を Milli-Q 水 (80 mL) に溶解して、NaOH 溶液で pH 8.0 に調整した後、Milli-Q 水で 100 mL にメスアップした後、121°C, 20 min オートクレーブ滅菌した。
- Tris-EDTA (TE) buffer (pH 8.0)

1M Tris-HCl (1 mL), 0.5M EDTA (200 μL) を Milli-Q 水で 100 mL にメスアップした後、121°C, 20 min オートクレーブ滅菌した。
- 20×Tris-acetate-EDTA (TAE)

Tris (96.8 g), EDTA-2Na (2.972 g), AcOH (22.84 mL) を RO 水 (1 L) に溶解した。
- 0.5×TAE

20×TAE (50 mL) を RO 水 (950 mL) に溶解した。
- EtBr 溶液 (10 mg/mL)

EtBr (10 mg) を sH₂O (1 mL) に溶解して、室温、遮光保存した。

- フェノール/クロロホルム溶液
 - Phenol (250 mL) を 70°C の Water Bath で溶解し, Chloroform (250 mL) と混合し, 褐色瓶に入れて保存した.
- 3M Sodium Acetate (pH 5.2)
 - AcONa (12.3 g) を sH₂O (40 mL) に溶解し, AcOH で pH 5.2 に調整し, sH₂O で 50 mL にメスアップした後, 121°C, 20 min オートクレーブ滅菌した.
- Sol I
 - Glucose (0.9 g) , 1M Tris-HCl (2.5 mL) , 0.5M EDTA (2 mL) を sH₂O で 100 mL にメスアップした後, 121°C, 20 min オートクレーブ滅菌し冷却した後, RNase A (10 mg/mL) 1 mL を加えて 4°C で保存した.
- 0.4M NaOH
 - NaOH (4 g) を sH₂O で 100 mL にメスアップした後, プラスチック容器に入れ, 室温で保存した.
- 2% SDS
 - SDS (2 g) を sH₂O で 100 mL にメスアップした後, 室温で保存した.
- Sol II
 - 0.4M NaOH と 2% SDS を 1:1 で混合し, 室温で保存した.
- Sol III
 - AcOK (29.44 g) , AcOH (11.5 mL) を sH₂O で 100 mL にメスアップした後, 室温で保存した.
- 30% acrylamide 保存液
 - acrylamide (116.8 g) と N,N'-methylenebisacrylamide (3.2 g) を sH₂O に溶解し, ろ過した後, 4°C で保存した.
- SDS-PAGE 用 10×泳動 buffer
 - Tris (30 g) と glycine (142.5 g) , SDS (10 g) を sH₂O に溶解し, 室温で保存した.
- SDS-PAGE 用 1×泳動 buffer
 - SDS-PAGE 用 10×泳動 buffer (100 mL) に RO 水 (900 mL) に溶解した.
- SDS-PAGE running gel 用 buffer
 - Tris (53.6 g) に SDS (1.2g) を sH₂O に溶解し, HCl で pH 8.8 にした後, sH₂O で 300 mL にメスアップして, 4°C で保存した.
- SDS-PAGE stacking gel 用 buffer
 - Tris (12.2 g) に SDS (0.8g) を sH₂O に溶解し, HCl で pH 6.8 にした後, sH₂O で 200 mL にメスアップして, 4°C で保存した.
- 10×Phosphate Buffered Saline (PBS) (-)
 - KCl (2 g) , KH₂PO₄ (2 g) , NaCl (80 g) , Na₂HPO₄·12H₂O (28.85 g) を Milli-Q 水 (1 L) に溶解した後, 121°C, 20 min オートクレーブ滅菌した.

- 1×PBS (-)
10×PBS (-) (50 mL) を Milli-Q 水 (450 mL) に溶解した後、121°C、20 min オートクレーブ滅菌した。
- FBS
FBS (500 mL) を 56°C で 30 min 不活化し、0.45 µm Filter でろ過滅菌した後、50 mL ずつ分注し、-20°C にて保存した。
- DMEM penicillin/streptomycin (P/S) (+)
DMEM (500 mL) に P/S (5 mL) を加え、4°C で保存した。
- 10% FBS-DMEM P/S (+)
DMEM P/S (+) (505 mL) に FBS (56.1mL) を加え、4°C で保存した。
- 10% FBS-DMEM P/S (-)
DMEM (500 mL) に FBS (55.0mL) を加え、4°C で保存した。
- RPMI penicillin/streptomycin (P/S) (+)
RPMI (500 mL) に P/S (5 mL) を加え、4°C で保存した。
- 10% FBS-RPMI P/S (+)
RPMI P/S (+) (505 mL) に FBS (56.1mL) を加え、4°C で保存した。
- 10% FBS-RPMI P/S (-)
RPMI (500 mL) に FBS (55.0mL) を加え、4°C で保存した。

4.3. 実験方法

1) phenol/chloroform 抽出

DNA 溶液と等量の phenol/chloroform を加え, vortex により混和し, 14,010 rpm で 5 min 遠心し, 水層 (DNA 含有溶液)を回収した.

2) EtOH 沈殿

DNA溶液に 2.5 倍量の 100% cold-EtOH, 1/10 量の 3M NaOAcを加え, vortexにより混和し, -80°Cで 20 minインキュベート後, 4°C, 14,010 rpmで 20 min遠心し, ペレットが剥がれないようにしながら, 上清を除去した. そこに, 70% cold-EtOHを適量加え, 4°C, 14,010 rpmで 15 min遠心し, ペレットが剥がれないようにしながら, 上清を除去し, ペレットをdry upし, 適量のsH₂Oでペレットを溶解した.

3) DNA 濃度の測定

Nano Drop により 260 nm の吸光度を測定し, O.D.値, DNA 濃度を付属ソフトにより計算した.

4) 接着細胞の継代

細胞が 80%コンフルエントになったときに, 以下の操作で継代を行った.

まず, 培地を取り除き, 1×PBS (-) で一回洗浄し, 0.05% trypsin-EDTAを加え, 5%CO₂-37°C, 5 minインキュベートした. インキュベート後, 培養に用いているFBS freeな培地を適量加え, 15 mLまたは, 50 mLチューブに回収し, RT, 1,500 rpmで 5 min遠心し, 上清を除去し, 10%FBSを添加した培地に懸濁し, セルカウントを行い, 3~4 日で 80%コンフルエントになるように細胞を播いた.

5) 浮遊細胞の継代

細胞が 80%コンフルエントになったときに, 以下の操作で継代を行った.

フラスコ内の細胞をピペットで懸濁し, 3~4 日で 80%コンフルエントになる量を残し, それ以外は除去し, 10%FBS を添加した培地を適量加えた.

6) siRNA の transfection

transfection の前日に 10%FBS-DMEM P/S (-) に懸濁した任意の量の 293T 細胞を播いた.

任意の量のsiRNAを分注し, そこにOpti-MEM Iを加えた. さらに適量のLipofectamin 2000 とOpti-MEM Iを加えRTで 5 minインキュベートした後, siRNA+Opti-MEM Iの入ったチューブに加え, RTで 20 minインキュベートした. その後, 293T細胞へ滴下し, 5%CO₂-37°Cで培養した.

7) Plasmid の transfection

transfection の前日に 10%FBS-DMEM P/S (-) に懸濁した任意の量の 293T 細胞を播いた.

任意の量のPlasmidを分注し, そこにOpti-MEM Iを加えた. さらに適量のLipofectamin 2000 とOpti-MEM Iを加えRTで 5 minインキュベートした後, siRNA+Opti-MEM Iの入っ

たチューブに加え、RTで 20 minインキュベートした。その後、293T細胞へ滴下し、5%CO₂-37°Cで培養した。

8) 細胞内タンパク質の回収

培地を除去した後、1×PBS (-)で2回洗浄した後、1×TNT buffer を適量加え、RTで15 min インキュベート後、cell lysate を回収し、4°C、14,010 rpm で5 min 遠心し、上清のみ回収した。

9) Protein assay

sampleをsH₂Oで5倍または10倍希釈し、96 well plate (flat) に10 μL分注した。また、検量線作成用にBovine serum albumin (BSA) を2,000, 1,000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 μg/mLにsH₂Oで希釈し、96 well plate (flat) に10 μL分注した。Reagent A (196 μL) と Reagent B (4 μL) を混合し、wellに加え、37°C、30 minインキュベートした後、Multiskan MSにより540 nmの吸光度を測定し、タンパク質濃度を算出した。

10) Western Blotting

Running gelとして、10%または12.5%アクリルアミドゲル (4.5 mL) をゲル板に流し込み、その上に、sH₂Oを重層した。固体化した時点でsH₂Oを取り除き、stacking gel (1.5 mL) をrunning gelの上に流し込みコームを差し込んで固体化させた。

タンパク補正されたサンプルの濃度をもとに、泳動するすべてのサンプルを適量0.5 mLチューブに取り、sH₂Oで13 μLにし、サンプルバッファーを2 μL加えてトータル15 μLにした後、95°C、3 minインキュベートした。

泳動槽にゲルをセットし、1×泳動 buffer を泳動槽に加え、100 Vで10 min 泳動した後、サンプル15 μLをwellに流し込み100 Vで泳動した。

メンブレン、濾紙を必要なサイズに切り、メンブレンをメタノールに10 sec 浸した後、RO水で洗い、トランスファーバッファーにメタノールを15%加えた溶液に30 min 以上浸した。

泳動が終わったら、ブロッキングを行った。ブロッターにセットした順序を以下に示す。

＋極 ろ紙→メンブレン→ゲル→ろ紙－極

空気の混入をローリングで押し出し、100 mA、1 hr でブロッキングを行った。

メンブレンをPBSで洗い、ブロッキングバッファーに浸し、Shaking mixerで4 hr 振とうした。その後、TBS/Tに浸し、Shaking mixerで10 min 洗浄を3回行った。

適当な比で混合した一次抗体ブロッキングバッファーでメンブレンを浸し、Shaking mixerでo/n振とうさせた後、TBS/Tに浸し、Shaking mixerで10 min 洗浄を3回行った。

次に適当な比で混合した二次抗体ブロッキングバッファーでメンブレンを浸し、Shaking mixerで1 hr 振とうさせた後、TBS/Tに浸し、Shaking mixerで10 min 洗浄を3回行った。

ECL-plus solution (solution A : solution B = 1000 : 25) をメンブレン全体にかけ、5 min

インキュベートした後、Image Quant Imager 400 により抗体特異的なタンパク質バンドを検出した。

11) CLEIAによるp24^{Gag}抗原濃度の測定

サンプルカップに培養上清を任意の希釈率になるように加え、検体希釈液を 250 μL になるように加えた。そこに、HIV p24 検体処理液を 50 μL 加えた。これをルミパルス f にセットし、HIV-1 p24^{Gag} 抗原量を測定し、測定値を以下の計算式により、上清中の p24 量を計算した。

$$\text{p24}^{\text{Gag}} [\text{pg/mL}] = (\text{測定値} \times 605.47 + 536.00) \times \text{希釈倍率}$$

13) 免疫沈降 (immunoprecipitation)

磁気ビーズの Dynabeads Protein G を用いた免疫沈降を行った。まず、Dynabeads Protein G の入った容器をボルテックスにより攪拌した。新しいエッペンチューブに citrate-phosphate buffer (25 mM クエン酸, 60 mM リン酸二水素ナトリウム) を 500 $\mu\text{L}/\text{sample}$ 加え、Dynabeads Protein G を 50 $\mu\text{L}/\text{sample}$ を加えた。磁石から外し、citrate-phosphate buffer を 500 $\mu\text{L}/\text{sample}$ 加えた。これをもう一度繰り返した。その後、citrate-phosphate buffer を 100 $\mu\text{L}/\text{sample}$ 加え、そこに免疫沈降する抗体を加え、室温で 40 min ローテーションした。その後、上清を取り除き、citrate-phosphate buffer で 3 回洗浄を行い、そこに細胞溶解液を適量加え室温 1 h ローテーションした。その後、1 \times PBS で 3 回洗浄した。20 μL の sample buffer を加え、95 $^{\circ}\text{C}$, 3 min インキュベートし、専用の磁石付きラックに 2 min 挿し新しいエッペンチューブに上清を移し、-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

14) HIV-1 の感染

1.5 mL チューブに MT-4 細胞を加え、そこに HIV-1 と polybrene [4mg/mL] を 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になるように加えた。5%-CO₂, 37 $^{\circ}\text{C}$ で 4 h 感染させ、1 \times PBS (-) で洗浄後、6 well plate に感染細胞を播き、5%-CO₂, 37 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。

5. 総括

本論文は「レトロウイルス複製に関与する宿主因子機能の解明とその応用」と題し、4章20節より構成される。

ヒトに感染するレトロウイルスとしてHTLVおよびHIVが知られている。レトロウイルスのゲノムは感染細胞の染色体に組み込まれるため、体内からウイルスを完全に排除することは不可能である。HTLV-1の潜伏期間は非常に長いため、生涯にわたってATLを発症する可能性は低い。HIVに対する治療では抗HIV薬を組み合わせた治療法 (anti-retrovirus therapy; ART) が顕著な効果を上げているが、HTLV感染者に対する治療は行わず、ATLを発症してから治療を行うが有効な治療法は未だ確立されていない。HTLV-1感染者は全世界に1-2千万人存在し、日本南西部、カリブ海沿岸地域、アフリカ中央部、南アメリカ、ソロモン諸島などの限られた地域に感染者が集中しており、日本国内では108-120万人と推定されている。一方、HIV-1は感染細胞内で活発にウイルス複製し、膨大なウイルス粒子を産生する。HIV-1感染者は、一般的に10年という潜伏期間を経て白血球を破壊して免疫機能を低下させ、AIDSを発症する。国際連合エイズ合同計画 (Joint United Nations Programme on HIV and AIDS; UNAIDS) の最新の報告によると2012年のHIV-1感染者の世界総数は、3,530万人 [3,220-3,880万人] に達しており、日本国内では2万人に達している。

レトロウイルスの発見後、精力的な研究によりウイルス複製に不可欠な宿主因子が次々と見出された。最近では、ウイルス複製に対し負に制御する宿主因子 (TRIM5a, APOBEC3 family, SAMHD1, Tetherin/BST-2) の存在も明らかにされてきており、既存のレトロウイルス治療に対する諸問題を克服する鍵として、ウイルス複製に係わる宿主因子の研究が注目されている。レトロウイルスは、宿主因子を利用することで複製を有利にし、一方で複製を阻害する宿主因子に拮抗するための機能を備えている。新規レトロウイルス治療薬の開発を考える上で、これらは非常に有意義な標的となりうる。そこで本研究では、レトロウイルス複製に関与する新たな宿主因子を探索し、これらの機能を解明するとともに、その知見を基に新たなレトロウイルス治療薬の研究開発につなげることを目的とした。

本論文第2章ではHTLV-1 RexによるRNA silencingの抑制について検討した。宿主の持つRNA silencing機構は、短鎖RNA (siRNAやmiRNA) が遺伝子の発現を制御する機構である。近年、RNA silencing機構とレトロウイルス複製の関係は精力的に研究され、これまでにHIV-1にコードされるmiRNAや宿主にコードされるHIV-1を標的としたmiRNAの存在が報告されており、HTLV-1ではATLの発症とmiRNAの関連も注目されている。また、HIV-1は宿主の持つRNA silencing機構から逃避するためRNA silencing suppressor (RSS) タンパク質 Tat をコードしていることが報告されている。そこで、HTLV-1にコードされるRexがRNA silencing機構を制御する機能を有するかについて検討した。第2節では、HTLV-1にコードされるRexがDicerの機能を阻害することを明らかにした。第3節ではRexによるDicerの阻害機構はRexとDicerの相互作用によること、Dicerとの相互作用にはRexの多量

体化が重要な役割を果たすこと、さらに Dicer の機能を阻害するためには Rex の全ての機能を備えている必要があることがわかった。また、第 4 節では Dicer の knock-down は HTLV-1 タンパク質発現を上昇させることがわかった。最後に第 5 節では Rex の発現はウイルス RNA を安定化することを明らかにした。以上の結果より、ウイルス RNA は Dicer の標的となりうることおよび宿主 miRNA による翻訳抑制という RNA silencing 機構の標的となりうることが示唆された。さらに、Rex は Dicer の機能を阻害することによりウイルス RNA を RNA silencing 機構から逃避させることでウイルス複製を有利にしていることを見出した。

本論文第 3 章では ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染制御について検討した。HIV-1 の転写活性には様々な宿主転写因子が関わっていることが明らかにされており、HIV-1 潜伏感染の維持には転写抑制因子によるヒストンの脱アセチル化が重要である。HIV-1 は潜伏感染することで感染細胞を宿主免疫および HIV-1 治療薬から逃避する。そこで、様々な遺伝子の転写制御に関わる宿主因子 KRAB-Zinc finger タンパク質の一種である ZBRK1 に着目し、HIV-1 潜伏感染を制御するかを検討した。第 2 節では、ZBRK1 が LTR から転写される Luc のみならず、全長 HIV-1 の転写をも抑制することが明らかとなった。また、ZBRK1 が Tat によるクロマチンを介した LTR 転写活性化を抑制することがわかった。第 3 節では ZBRK1 の knock-down が LTR 転写活性を促進すること、LTR 転写活性の上昇は HIV-1 複製を促進することを明らかにした。また、ZBRK1 の knock-down は宿主染色体に組み込まれたプロウイルス転写活性を促進することがわかった。このことから、ZBRK1 は LTR 転写活性を抑制することで HIV-1 潜伏感染を制御することが示唆された。第 4 節では、ZBRK1 の Zinc finger motif は LTR の (-245)- (-107) の領域に結合することが示唆された。さらに、ZBRK1 による LTR 転写制御は転写活性化因子 NF- κ B および Sp-1 や Tat の影響を受けないことから、これらの転写活性化因子とは独立して直接 LTR 転写活性を抑制することが明らかとなった。第 5 節では ZBRK1 による LTR 転写抑制には TRIM28 との相互作用および HDAC2 によるヒストン脱アセチル化が必須因子であることをつきとめた。以上の結果より、ZBRK1 によるヒストンの脱アセチル化はプロウイルスの LTR 転写活性を抑制し、HIV-1 の潜伏感染を制御する一因となることを見出した。

本論文第 4 章では PGA1 による APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製制御について検討した。APOBEC3G は HIV-1 複製を負に制御する宿主因子であり、HIV-1 粒子に取り込まれることで HIV-1 複製を強力に抑制する。しかし、HIV-1 は APOBEC3G を分解する Vif をコードしている。我々は、これまでに Hsp70 が Vif と APOBEC3G の結合を阻害することで Vif による APOBEC3G 分解を抑制し、さらに HIV-1 粒子への APOBEC3G の取り込みを促進することを報告した。そこで、Hsp70 発現を誘導する低分子化合物が新たな HIV-1 治療薬の開発につながるのではないかと仮説の基、探索を行った。Prostaglandin A1 (PGA1) による Hsp70 発現の誘導は、APOBEC3G の分解を抑制し、ウイルス粒子への APOBEC3G の取り込みを上昇させることで感染性が抑制することを明らかにした。さらに、PGA1 により内在性の APOBEC3G に対しても分解の抑制がみられ、1 回の添加で 14 日間以上にわたり HIV-1 複製

を抑制した。このことから、Hsp70 の発現誘導は HIV-1 増殖・複製を効果的に抑制できることが示唆された。また、Hsp70 は宿主内在性の因子であることから、Hsp70 の発現による副作用は考えにくく、さらに本研究で明らかにした HIV-1 増殖・複製抑制機構は既存薬剤の作用点とも異なることから、Hsp70 発現を誘導する低分子化合物 PGA1 は新たな HIV-1 治療薬として期待される。

以上、HTLV-1 Rex による RNA silencing 機構の制御、ZBRK1 による HIV-1 潜伏感染制御など、新たな宿主因子とレトロウイルスの相互作用分子メカニズムを明らかにした。そして、HIV-1 Vif による APOBEC3G の分解を制御する宿主因子 Hsp70 を発現誘導する新規抗 HIV-1 剤 Prostaglandin A1 (PGA1) の開発に成功した。これらの知見より、レトロウイルスと宿主因子の相互関係を明らかにすることは新たなレトロウイルス治療薬の開発につながると期待される。

6. 参考文献

- 1 Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. & Uchino, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**, 481-492 (1977).
- 2 Miyoshi, I. *et al.* A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gann* **71**, 155-156 (1980).
- 3 Hinuma, Y. *et al.* Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6476-6480 (1981).
- 4 Poiesz, B. J. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7415-7419 (1980).
- 5 Kalyanaraman, V. S. *et al.* A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**, 571-573 (1982).
- 6 Yoshida, M., Miyoshi, I. & Hinuma, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2031-2035 (1982).
- 7 Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y. & Yoshida, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 3618-3622 (1983).
- 8 du Bois, R. M., Branthwaite, M. A., Mikhail, J. R. & Batten, J. C. Primary Pneumocystis carinii and cytomegalovirus infections. *Lancet* **2**, 1339 (1981).
- 9 Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871 (1983).
- 10 Gallo, R. C. *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503 (1984).
- 11 Gallo, R. C. & Montagnier, L. The chronology of AIDS research. *Nature* **326**, 435-436, doi:10.1038/326435a0 (1987).
- 12 Clavel, F. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346 (1986).
- 13 Etoh, K. *et al.* Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo. *Cancer Res* **57**, 4862-4867 (1997).
- 14 Temin, H. M. & Mizutani, S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**, 1211-1213 (1970).
- 15 Baltimore, D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**, 1209-1211 (1970).
- 16 Franchini, G., Fukumoto, R. & Fullen, J. R. T-cell control by human T-cell

- leukemia/lymphoma virus type 1. *Int J Hematol* **78**, 280-296 (2003).
- 17 Gaudray, G. *et al.* The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol* **76**, 12813-12822 (2002).
- 18 Cavanagh, M. H. *et al.* HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology* **3**, 15, doi:10.1186/1742-4690-3-15 (2006).
- 19 Fujisawa, J., Seiki, M., Sato, M. & Yoshida, M. A transcriptional enhancer sequence of HTLV-I is responsible for trans-activation mediated by p40 chi HTLV-I. *EMBO J* **5**, 713-718 (1986).
- 20 Brady, J., Jeang, K. T., Duvall, J. & Khoury, G. Identification of p40x-responsive regulatory sequences within the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *J Virol* **61**, 2175-2181 (1987).
- 21 Wycuff, D. R., Yanites, H. L. & Marriott, S. J. Identification of a functional serum response element in the HTLV-I LTR. *Virology* **324**, 540-553, doi:10.1016/j.virol.2004.04.008 (2004).
- 22 Winter, H. Y. & Marriott, S. J. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum response factor DNA binding and alters site selection. *J Virol* **81**, 6089-6098, doi:10.1128/JVI.02179-06 (2007).
- 23 Collins, N. D. *et al.* Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity in vivo. *Blood* **91**, 4701-4707 (1998).
- 24 Albrecht, B. *et al.* Human T-lymphotropic virus type 1 open reading frame I p12(I) is required for efficient viral infectivity in primary lymphocytes. *J Virol* **74**, 9828-9835 (2000).
- 25 Mulloy, J. C., Crownley, R. W., Fullen, J., Leonard, W. J. & Franchini, G. The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12I proteins bind the interleukin-2 receptor beta and gamma chains and affects their expression on the cell surface. *J Virol* **70**, 3599-3605 (1996).
- 26 Nicot, C. *et al.* HTLV-1 p12(I) protein enhances STAT5 activation and decreases the interleukin-2 requirement for proliferation of primary human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* **98**, 823-829 (2001).
- 27 Ding, W. *et al.* Endoplasmic reticulum and cis-Golgi localization of human T-lymphotropic virus type 1 p12(I): association with calreticulin and calnexin. *J Virol* **75**, 7672-7682, doi:10.1128/JVI.75.16.7672-7682.2001 (2001).
- 28 Johnson, J. M. *et al.* Free major histocompatibility complex class I heavy chain is preferentially targeted for degradation by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12(I) protein. *J Virol* **75**, 6086-6094, doi:10.1128/JVI.75.13.6086-6094.2001 (2001).
- 29 Zhang, W. *et al.* Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by

- binding CREB binding protein/p300. *J Virol* **75**, 9885-9895, doi:10.1128/JVI.75.20.9885-9895.2001 (2001).
- 30 Nicot, C. *et al.* HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat Med* **10**, 197-201, doi:10.1038/nm984 (2004).
- 31 Awasthi, S. *et al.* A human T-cell lymphotropic virus type 1 enhancer of Myc transforming potential stabilizes Myc-TIP60 transcriptional interactions. *Mol Cell Biol* **25**, 6178-6198, doi:10.1128/MCB.25.14.6178-6198.2005 (2005).
- 32 Baydoun, H. H., Pancewicz, J. & Nicot, C. Human T-lymphotropic type 1 virus p30 inhibits homologous recombination and favors unfaithful DNA repair. *Blood* **117**, 5897-5906, doi:10.1182/blood-2010-08-304600 (2011).
- 33 Lefèbvre, L. *et al.* Oncoviral bovine leukemia virus G4 and human T-cell leukemia virus type 1 p13(II) accessory proteins interact with farnesyl pyrophosphate synthetase. *J Virol* **76**, 1400-1414 (2002).
- 34 Hiraragi, H. *et al.* Human T-lymphotropic virus type 1 mitochondrion-localizing protein p13II sensitizes Jurkat T cells to Ras-mediated apoptosis. *J Virol* **79**, 9449-9457, doi:10.1128/JVI.79.15.9449-9457.2005 (2005).
- 35 Ching, Y. P., Chan, S. F., Jeang, K. T. & Jin, D. Y. The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nat Cell Biol* **8**, 717-724, doi:10.1038/ncb1432 (2006).
- 36 Grassmann, R., Aboud, M. & Jeang, K. T. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* **24**, 5976-5985, doi:10.1038/sj.onc.1208978 (2005).
- 37 Peloponese, J. M., Haller, K., Miyazato, A. & Jeang, K. T. Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18974-18979, doi:10.1073/pnas.0506659103 (2005).
- 38 Yoshida, M. Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control. *Annu Rev Immunol* **19**, 475-496, doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.475 (2001).
- 39 Green, J. E., Baird, A. M., Hinrichs, S. H., Klintworth, G. K. & Jay, G. Adrenal medullary tumors and iris proliferation in a transgenic mouse model of neurofibromatosis. *Am J Pathol* **140**, 1401-1410 (1992).
- 40 Green, J. E., Hinrichs, S. H., Vogel, J. & Jay, G. Exocrinopathy resembling Sjögren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature* **341**, 72-74, doi:10.1038/341072a0 (1989).
- 41 Grossman, W. J. *et al.* Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1057-1061 (1995).
- 42 Hasegawa, H. *et al.* Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for

- the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* **12**, 466-472, doi:10.1038/nm1389 (2006).
- 43 Hinrichs, S. H., Nerenberg, M., Reynolds, R. K., Khoury, G. & Jay, G. A transgenic mouse model for human neurofibromatosis. *Science* **237**, 1340-1343 (1987).
- 44 Iwakura, Y. *et al.* Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science* **253**, 1026-1028 (1991).
- 45 Kwon, H. *et al.* Lethal cutaneous disease in transgenic mice conditionally expressing type I human T cell leukemia virus Tax. *J Biol Chem* **280**, 35713-35722, doi:10.1074/jbc.M504848200 (2005).
- 46 Nerenberg, M., Hinrichs, S. H., Reynolds, R. K., Khoury, G. & Jay, G. The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science* **237**, 1324-1329 (1987).
- 47 Takeda, S. *et al.* Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* **109**, 559-567, doi:10.1002/ijc.20007 (2004).
- 48 Koiwa, T. *et al.* 5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo. *J Virol* **76**, 9389-9397 (2002).
- 49 Tamiya, S. *et al.* Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* **88**, 3065-3073 (1996).
- 50 Taniguchi, Y. *et al.* Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology* **2**, 64, doi:10.1186/1742-4690-2-64 (2005).
- 51 Kannagi, M., Ohashi, T., Harashima, N., Hanabuchi, S. & Hasegawa, A. Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection. *Trends Microbiol* **12**, 346-352, doi:10.1016/j.tim.2004.05.005 (2004).
- 52 Hidaka, M., Inoue, J., Yoshida, M. & Seiki, M. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J* **7**, 519-523 (1988).
- 53 Ahmed, Y. F., Hanly, S. M., Malim, M. H., Cullen, B. R. & Greene, W. C. Structure-function analyses of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev RNA response elements: insights into the mechanism of Rex and Rev action. *Genes Dev* **4**, 1014-1022 (1990).
- 54 Hanly, S. M. *et al.* Comparative analysis of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev trans-regulatory proteins and their RNA response elements. *Genes Dev* **3**, 1534-1544 (1989).
- 55 Toyoshima, H. *et al.* Secondary structure of the human T-cell leukemia virus type 1 rex-responsive element is essential for rex regulation of RNA processing and transport of unspliced RNAs. *J Virol* **64**, 2825-2832 (1990).
- 56 Ballaun, C. *et al.* Functional analysis of human T-cell leukemia virus type I rex-response

- element: direct RNA binding of Rex protein correlates with in vivo activity. *J Virol* **65**, 4408-4413 (1991).
- 57 Askjaer, P. & Kjems, J. Mapping of multiple RNA binding sites of human T-cell lymphotropic virus type I rex protein within 5'- and 3'-Rex response elements. *J Biol Chem* **273**, 11463-11471 (1998).
- 58 Ahmed, Y. F., Gilmartin, G. M., Hanly, S. M., Nevins, J. R. & Greene, W. C. The HTLV-I Rex response element mediates a novel form of mRNA polyadenylation. *Cell* **64**, 727-737 (1991).
- 59 Hakata, Y., Umemoto, T., Matsushita, S. & Shida, H. Involvement of human CRM1 (exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* **72**, 6602-6607 (1998).
- 60 Basbous, J. *et al.* The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J Biol Chem* **278**, 43620-43627, doi:10.1074/jbc.M307275200 (2003).
- 61 Matsumoto, J., Ohshima, T., Isono, O. & Shimotohno, K. HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene* **24**, 1001-1010, doi:10.1038/sj.onc.1208297 (2005).
- 62 Thébault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C. & Mesnard, J. M. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* **562**, 165-170, doi:10.1016/S0014-5793(04)00225-X (2004).
- 63 Arnold, J. *et al.* Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood* **107**, 3976-3982, doi:10.1182/blood-2005-11-4551 (2006).
- 64 Valeri, V. W. *et al.* Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood* **116**, 3809-3817, doi:10.1182/blood-2010-05-284141 (2010).
- 65 Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M. & Matsuoka, M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 720-725, doi:10.1073/pnas.0507631103 (2006).
- 66 Bangham, C. R. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): persistence and immune control. *Int J Hematol* **78**, 297-303 (2003).
- 67 Fan, N. *et al.* Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *J Clin Microbiol* **30**, 905-910 (1992).
- 68 Igakura, T. *et al.* Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* **299**, 1713-1716, doi:10.1126/science.1080115 (2003).
- 69 Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell

- activation. *Science* **285**, 221-227 (1999).
- 70 Fukudome, K. *et al.* Strong induction of ICAM-1 in human T cells transformed by human T-cell-leukemia virus type 1 and depression of ICAM-1 or LFA-1 in adult T-cell-leukemia-derived cell lines. *Int J Cancer* **52**, 418-427 (1992).
- 71 Nejmeddine, M. & Bangham, C. R. The HTLV-1 Virological Synapse. *Viruses* **2**, 1427-1447, doi:10.3390/v2071427 (2010).
- 72 Pais-Correia, A. M. *et al.* Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* **16**, 83-89, doi:10.1038/nm.2065 (2010).
- 73 Macatonia, S. E., Cruickshank, J. K., Rudge, P. & Knight, S. C. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 1699-1706 (1992).
- 74 Koyanagi, Y. *et al.* In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* **196**, 25-33 (1993).
- 75 Manel, N. *et al.* The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* **115**, 449-459 (2003).
- 76 Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y. & Ruscetti, F. W. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol* **79**, 12692-12702, doi:10.1128/JVI.79.20.12692-12702.2005 (2005).
- 77 Ghez, D. *et al.* Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* **80**, 6844-6854, doi:10.1128/JVI.02719-05 (2006).
- 78 Ghez, D., Lepelletier, Y., Jones, K. S., Pique, C. & Hermine, O. Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex. *Retrovirology* **7**, 99, doi:10.1186/1742-4690-7-99 (2010).
- 79 Karpas, A. Unusual virus produced by cultured cells from a patient with AIDS. *Mol Biol Med* **1**, 457-459 (1983).
- 80 Jacque, J. M. *et al.* Permanent occupancy of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer by NF-kappa B is needed for persistent viral replication in monocytes. *J. Virol.* **70**, 2930-2938 (1996).
- 81 Pereira, L. A., Bentley, K., Peeters, A., Churchill, M. J. & Deacon, N. J. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic. Acids. Res.* **28**, 663-668 (2000).
- 82 Imai, K. & Okamoto, T. Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *J. Biol. Chem.* **281**, 12495-12505 (2006).
- 83 Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M. & Sundquist, W. I. Crystal structures of the trimeric human immunodeficiency virus type 1 matrix protein: implications

- for membrane association and assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 3099-3104 (1996).
- 84 Gamble, T. R. *et al.* Structure of the carboxyl-terminal dimerization domain of the HIV-1 capsid protein. *Science.* **278**, 849-853 (1997).
- 85 Freed, E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology.* **251**, 1-15 (1998).
- 86 Ganser, B. K., Li, S., Klishko, V. Y., Finch, J. T. & Sundquist, W. I. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. *Science.* **283**, 80-83 (1999).
- 87 Li, S., Hill, C. P., Sundquist, W. I. & Finch, J. T. Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein. *Nature.* **407**, 409-413 (2000).
- 88 VerPlank, L. *et al.* Tsg101, a homologue of ubiquitin-conjugating (E2) enzymes, binds the L domain in HIV type 1 Pr55(Gag). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7724-7729 (2001).
- 89 Adamson, C. S. & Jones, I. M. The molecular basis of HIV capsid assembly--five years of progress. *Rev. Med. Virol.* **14**, 107-121 (2004).
- 90 Jacks, T. *et al.* Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature.* **331**, 280-283 (1988).
- 91 Biswas, P., Jiang, X., Pacchia, A. L., Dougherty, J. P. & Peltz, S. W. The human immunodeficiency virus type 1 ribosomal frameshifting site is an invariant sequence determinant and an important target for antiviral therapy. *J. Virol.* **78**, 2082-2087 (2004).
- 92 Wu, L. *et al.* CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature.* **384**, 179-183 (1996).
- 93 Karn, J. Tackling Tat. *J. Mol. Biol.* **293**, 235-254 (1999).
- 94 Rana, T. M. & Jeang, K. T. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**, 175-185 (1999).
- 95 Stauber, R., Gaitanaris, G. A. & Pavlakis, G. N. Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm. *Virology.* **213**, 439-449 (1995).
- 96 Fritz, C. C., Zapp, M. L. & Green, M. R. A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature.* **376**, 530-533 (1995).
- 97 Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Madore, S. & Cullen, B. R. Identification of a novel cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell.* **82**, 485-494 (1995).
- 98 Saavedra, C., Felber, B. & Izaurralde, E. The simian retrovirus-1 constitutive transport element, unlike the HIV-1 RRE, uses factors required for cellular mRNA export. *Curr. Biol.* **7**, 619-628 (1997).
- 99 Aiken, C., Konner, J., Landau, N. R., Lenburg, M. E. & Trono, D. Nef induces CD4

- endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell*. **76**, 853-864 (1994).
- 100 Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F. & Heard, J. M. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**, 338-342 (1996).
- 101 Collins, K. L., Chen, B. K., Kalams, S. A., Walker, B. D. & Baltimore, D. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*. **391**, 397-401 (1998).
- 102 Cohen, G. B. *et al.* The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV-infected cells from NK cells. *Immunity*. **10**, 661-671 (1999).
- 103 Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H. & Greene, W. C. HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature*. **410**, 834-838 (2001).
- 104 Blagoveshchenskaya, A. D., Thomas, L., Feliciangeli, S. F., Hung, C. H. & Thomas, G. HIV-1 Nef downregulates MHC-I by a PACS-1- and PI3K-regulated ARF6 endocytic pathway. *Cell*. **111**, 853-866 (2002).
- 105 Shinya, E. *et al.* Endogenously expressed HIV-1 nef down-regulates antigen-presenting molecules, not only class I MHC but also CD1a, in immature dendritic cells. *Virology*. **326**, 79-89 (2004).
- 106 Ahmad, N. & Venkatesan, S. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. *Science* **241**, 1481-1485 (1988).
- 107 Niederman, T. M., Thielan, B. J. & Ratner, L. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1128-1132 (1989).
- 108 Glushakova, S. *et al.* Nef enhances human immunodeficiency virus replication and responsiveness to interleukin-2 in human lymphoid tissue *ex vivo*. *J Virol* **73**, 3968-3974 (1999).
- 109 Simmons, A., Aluvihare, V. & McMichael, A. Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators. *Immunity* **14**, 763-777 (2001).
- 110 Arora, V. K., Fredericksen, B. L. & Garcia, J. V. Nef: agent of cell subversion. *Microbes Infect* **4**, 189-199 (2002).
- 111 Papkalla, A., Munch, J., Otto, C. & Kirchhoff, F. Nef enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity and replication independently of viral coreceptor tropism. *J Virol* **76**, 8455-8459 (2002).
- 112 Lundquist, C. A., Zhou, J. & Aiken, C. Nef stimulates human immunodeficiency virus type

- 1 replication in primary T cells by enhancing virion-associated gp120 levels: coreceptor-dependent requirement for Nef in viral replication. *J Virol* **78**, 6287-6296, doi:10.1128/JVI.78.12.6287-6296.2004 (2004).
- 113 Kumar, M. & Mitra, D. Heat shock protein 40 is necessary for human immunodeficiency virus-1 Nef-mediated enhancement of viral gene expression and replication. *J Biol Chem* **280**, 40041-40050, doi:10.1074/jbc.M508904200 (2005).
- 114 Wolf, D. *et al.* HIV Nef enhances Tat-mediated viral transcription through a hnRNP-K-nucleated signaling complex. *Cell Host Microbe* **4**, 398-408, doi:10.1016/j.chom.2008.08.013 (2008).
- 115 Levy, D. N., Fernandes, L. S., Williams, W. V. & Weiner, D. B. Induction of cell differentiation by human immunodeficiency virus 1 vpr. *Cell*. **72**, 541-550 (1993).
- 116 Zhao, L. J., Mukherjee, S. & Narayan, O. Biochemical mechanism of HIV-I Vpr function. Specific interaction with a cellular protein. *J. Biol. Chem.* **269**, 15577-15582 (1994).
- 117 Subbramanian, R. A. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages. *J. Exp. Med.* **187**, 1103-1111 (1998).
- 118 Yasuda, J., Miyao, T., Kamata, M., Aida, Y. & Iwakura, Y. T cell apoptosis causes peripheral T cell depletion in mice transgenic for the HIV-1 vpr gene. *Virology*. **285**, 181-192 (2001).
- 119 Thotala, D. *et al.* Structure-functional analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpr: role of leucine residues on Vpr-mediated transactivation and virus replication. *Virology*. **328**, 89-100 (2004).
- 120 Goh, W. C., Manel, N. & Emerman, M. The human immunodeficiency virus Vpr protein binds Cdc25C: implications for G2 arrest. *Virology*. **318**, 337-349 (2004).
- 121 Thierry, S. *et al.* Cell cycle arrest in G2 induces human immunodeficiency virus type 1 transcriptional activation through histone acetylation and recruitment of CBP, NF-kappaB, and c-Jun to the long terminal repeat promoter. *J. Virol.* **78**, 12198-12206 (2004).
- 122 Strebel, K., Klimkait, T., Maldarelli, F. & Martin, M. A. Molecular and biochemical analyses of human immunodeficiency virus type 1 vpu protein. *J. Virol.* **63**, 3784-3791 (1989).
- 123 Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A. & Strebel, K. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J. Virol.* **66**, 7193-7200 (1992).
- 124 Yao, X. J., Gottlinger, H., Haseltine, W. A. & Cohen, E. A. Envelope glycoprotein and CD4 independence of vpu-facilitated human immunodeficiency virus type 1 capsid export. *J. Virol.* **66**, 5119-5126 (1992).
- 125 Akari, H., Bour, S., Kao, S., Adachi, A. & Strebel, K. The human immunodeficiency virus type 1 accessory protein Vpu induces apoptosis by suppressing the nuclear factor

- kappaB-dependent expression of antiapoptotic factors. *J. Exp. Med.* **194**, 1299-1311 (2001).
- 126 Levesque, K., Zhao, Y. S. & Cohen, E. A. Vpu exerts a positive effect on HIV-1 infectivity by down-modulating CD4 receptor molecules at the surface of HIV-1-producing cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 28346-28353 (2003).
- 127 Varthakavi, V., Smith, R. M., Bour, S. P., Strebel, K. & Spearman, P. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 15154-15159 (2003).
- 128 Hsu, K., Seharaseyon, J., Dong, P., Bour, S. & Marban, E. Mutual functional destruction of HIV-1 Vpu and host TASK-1 channel. *Mol. Cell.* **14**, 259-267 (2004).
- 129 Derrien, M. *et al.* Human immunodeficiency virus 1 downregulates cell surface expression of the non-classical major histocompatibility class I molecule HLA-G1. *J. Gen. Virol.* **85**, 1945-1954 (2004).
- 130 Gallay, P., Hope, T., Chin, D. & Trono, D. HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 9825-9830 (1997).
- 131 Haffar, O. K. *et al.* Two nuclear localization signals in the HIV-1 matrix protein regulate nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex. *J. Mol. Biol.* **299**, 359-368 (2000).
- 132 Lusic, M., Marcello, A., Cereseto, A. & Giacca, M. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *EMBO. J.* **22**, 6550-6561 (2003).
- 133 Paillart, J. C., Skripkin, E., Ehresmann, B., Ehresmann, C. & Marquet, R. A loop-loop "kissing" complex is the essential part of the dimer linkage of genomic HIV-1 RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 5572-5577 (1996).
- 134 Sakuragi, J., Ueda, S., Iwamoto, A. & Shioda, T. Possible role of dimerization in human immunodeficiency virus type 1 genome RNA packaging. *J. Virol.* **77**, 4060-4069 (2003).
- 135 Sakuragi, J., Iwamoto, A. & Shioda, T. Dissociation of genome dimerization from packaging functions and virion maturation of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **76**, 959-967 (2002).
- 136 Zhang, H. *et al.* The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA. *Nature.* **424**, 94-98 (2003).
- 137 Lecossier, D., Bouchonnet, F., Clavel, F. & Hance, A. J. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science.* **300**, 1112 (2003).
- 138 Mangeat, B. *et al.* Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature.* **424**, 99-103 (2003).
- 139 Harris, R. S. *et al.* DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell.* **113**, 803-809 (2003).

- 140 Shindo, K. *et al.* The enzymatic activity of CEM15/Apobec-3G is essential for the regulation of the infectivity of HIV-1 virion but not a sole determinant of its antiviral activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 44412-44416 (2003).
- 141 Yu, Q. *et al.* Single-strand specificity of APOBEC3G accounts for minus-strand deamination of the HIV genome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 435-442 (2004).
- 142 Hache, G., Liddament, M. T. & Harris, R. S. The retroviral hypermutation specificity of APOBEC3F and APOBEC3G is governed by the C-terminal DNA cytosine deaminase domain. *J. Biol. Chem.* **280**, 10920-10924 (2005).
- 143 Newman, E. N. *et al.* Antiviral function of APOBEC3G can be dissociated from cytidine deaminase activity. *Curr. Biol.* **15**, 166-170 (2005).
- 144 Chiu, Y. L. *et al.* Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells. *Nature.* **435**, 108-114 (2005).
- 145 Liddament, M. T., Brown, W. L., Schumacher, A. J. & Harris, R. S. APOBEC3F properties and hypermutation preferences indicate activity against HIV-1 in vivo. *Curr. Biol.* **14**, 1385-1391 (2004).
- 146 Kreisberg, J. F., Yonemoto, W. & Greene, W. C. Endogenous factors enhance HIV infection of tissue naive CD4 T cells by stimulating high molecular mass APOBEC3G complex formation. *J. Exp. Med.* **203**, 865-870 (2006).
- 147 Mariani, R. *et al.* Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell.* **114**, 21-31 (2003).
- 148 Marin, M., Rose, K. M., Kozak, S. L. & Kabat, D. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat. Med.* **9**, 1398-1403 (2003).
- 149 Sheehy, A. M., Gaddis, N. C. & Malim, M. H. The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* **9**, 1404-1407 (2003).
- 150 Stopak, K., de Noronha, C., Yonemoto, W. & Greene, W. C. HIV-1 Vif blocks the antiviral activity of APOBEC3G by impairing both its translation and intracellular stability. *Mol. Cell.* **12**, 591-601 (2003).
- 151 Kao, S. *et al.* Production of infectious human immunodeficiency virus type 1 does not require depletion of APOBEC3G from virus-producing cells. *Retrovirology.* **1**, 27 (2004).
- 152 Santa-Marta, M., da Silva, F. A., Fonseca, A. M. & Goncalves, J. HIV-1 Vif can directly inhibit apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like 3G-mediated cytidine deamination by using a single amino acid interaction and without protein degradation. *J. Biol. Chem.* **280**, 8765-8775 (2005).
- 153 Towers, G. J. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology* **4**, 40, doi:10.1186/1742-4690-4-40 (2007).
- 154 Stremlau, M. *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection

- in Old World monkeys. *Nature* **427**, 848-853, doi:10.1038/nature02343 (2004).
- 155 Nisole, S., Stoye, J. P. & Saib, A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* **3**, 799-808, doi:10.1038/nrmicro1248 (2005).
- 156 Luban, J. Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **81**, 1054-1061, doi:10.1128/jvi.01519-06 (2007).
- 157 Suzuki, Y. & Craigie, R. The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol* **5**, 187-196, doi:10.1038/nrmicro1579 (2007).
- 158 Stremlau, M. *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. **427**, 848-853 (2004).
- 159 Uchil, P. D., Quinlan, B. D., Chan, W. T., Luna, J. M. & Mothes, W. TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. *PLoS Pathog* **4**, e16, doi:10.1371/journal.ppat.0040016 (2008).
- 160 Barr, S. D., Smiley, J. R. & Bushman, F. D. The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. *PLoS Pathog* **4**, e1000007, doi:10.1371/journal.ppat.1000007 (2008).
- 161 Malim, M. H. & Emerman, M. HIV-1 accessory proteins--ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host Microbe* **3**, 388-398, doi:10.1016/j.chom.2008.04.008 (2008).
- 162 Varthakavi, V., Smith, R. M., Bour, S. P., Strebel, K. & Spearman, P. Viral protein U counteracts a human host cell restriction that inhibits HIV-1 particle production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15154-15159, doi:10.1073/pnas.2433165100 (2003).
- 163 Neil, S. J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature* **451**, 425-430, doi:10.1038/nature06553 (2008).
- 164 Van Damme, N. *et al.* The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein. *Cell Host Microbe* **3**, 245-252, doi:10.1016/j.chom.2008.03.001 (2008).
- 165 Omoto, S. & Fujii, Y. R. Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA. *J Gen Virol* **86**, 751-755, doi:10.1099/vir.0.80449-0 (2005).
- 166 Ouellet, D. L. *et al.* Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Res* **36**, 2353-2365, doi:10.1093/nar/gkn076 (2008).
- 167 Kaul, D., Ahlawat, A. & Gupta, S. D. HIV-1 genome-encoded hiv1-mir-H1 impairs cellular responses to infection. *Mol Cell Biochem* **323**, 143-148, doi:10.1007/s11010-008-9973-4 (2009).
- 168 Klase, Z. *et al.* HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression. *Retrovirology* **6**, 18, doi:10.1186/1742-4690-6-18 (2009).
- 169 Lamers, S. L., Fogel, G. B. & McGrath, M. S. HIV-miR-H1 evolvability during HIV

- pathogenesis. *Biosystems* **101**, 88-96, doi:10.1016/j.biosystems.2010.05.001 (2010).
- 170 Narayanan, A., Kehn-Hall, K., Bailey, C. & Kashanchi, F. Analysis of the roles of HIV-derived microRNAs. *Expert Opin Biol Ther* **11**, 17-29, doi:10.1517/14712598.2011.540564 (2011).
- 171 Sanghvi, V. R. & Steel, L. F. A re-examination of global suppression of RNA interference by HIV-1. *PLoS One* **6**, e17246, doi:10.1371/journal.pone.0017246 (2011).
- 172 Schopman, N. C. *et al.* Deep sequencing of virus-infected cells reveals HIV-encoded small RNAs. *Nucleic Acids Res* **40**, 414-427, doi:10.1093/nar/gkr719 (2012).
- 173 Huang, J. *et al.* Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* **13**, 1241-1247, doi:10.1038/nm1639 (2007).
- 174 Sun, G. & Rossi, J. J. MicroRNAs and their potential involvement in HIV infection. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 675-681, doi:10.1016/j.tips.2011.07.003 (2011).
- 175 Chiang, K., Sung, T. L. & Rice, A. P. Regulation of cyclin T1 and HIV-1 Replication by microRNAs in resting CD4+ T lymphocytes. *J Virol* **86**, 3244-3252, doi:10.1128/JVI.05065-11 (2012).
- 176 Sun, G. *et al.* Interplay between HIV-1 infection and host microRNAs. *Nucleic Acids Res* **40**, 2181-2196, doi:10.1093/nar/gkr961 (2012).
- 177 Swaminathan, S. *et al.* Differential regulation of the Let-7 family of microRNAs in CD4+ T cells alters IL-10 expression. *J Immunol* **188**, 6238-6246, doi:10.4049/jimmunol.1101196 (2012).
- 178 Victoriano, A. F. & Okamoto, T. Transcriptional control of HIV replication by multiple modulators and their implication for a novel antiviral therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* **28**, 125-138, doi:10.1089/AID.2011.0263 (2012).
- 179 Zhang, H. S., Wu, T. C., Sang, W. W. & Ruan, Z. MiR-217 is involved in Tat-induced HIV-1 long terminal repeat (LTR) transactivation by down-regulation of SIRT1. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 1017-1023, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.014 (2012).
- 180 Pichler, K., Schneider, G. & Grassmann, R. MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes. *Retrovirology* **5**, 100, doi:10.1186/1742-4690-5-100 (2008).
- 181 Yeung, M. L. *et al.* Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and tumor protein 53-induced nuclear protein 1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by human T-cell lymphotropic virus 1. *Cancer Res* **68**, 8976-8985, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-0769 (2008).
- 182 Bellon, M., Lepelletier, Y., Hermine, O. & Nicot, C. Dereglulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* **113**, 4914-4917, doi:10.1182/blood-2008-11-189845 (2009).

- 183 Bivalkar-Mehla, S. *et al.* Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Res* **155**, 1-9, doi:10.1016/j.virusres.2010.10.003 (2011).
- 184 Bennasser, Y., Le, S. Y., Benkirane, M. & Jeang, K. T. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* **22**, 607-619, doi:10.1016/j.immuni.2005.03.010 (2005).
- 185 Bennasser, Y. & Jeang, K. T. HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology* **3**, 95, doi:10.1186/1742-4690-3-95 (2006).
- 186 Lin, J. & Cullen, B. R. Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J Virol* **81**, 12218-12226, doi:10.1128/JVI.01390-07 (2007).

7. 博士後期課程における業績

発表論文

主論文

- 1.) **Makoto Abe**, Hitoshi Suzuki, Hironori Nishitsuji, Hisatoshi Shida and Hiroshi Takaku. Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. *FEBS Lett.* 2010; **584** 4313-4318. (本論文第 2 章)
- 2.) Hironori Nishitsuji, **Makoto Abe**, Reila Sawada and Hiroshi Takaku. ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription. *FEBS Lett.* 2012; **586** 3562-3568. (本論文第 3 章)
- 3.) Ryuichi Sugiyama*, **Makoto Abe***, Hironori Nishitsuji, Yuko Murakami, Hiroaki Takeuchi and Hiroshi Takaku. Induction of heat-shock protein 70 by prostaglandin A₁ inhibits HIV-1 Vif-mediated degradation of APOBEC3G. *Antiviral Res.* 2013; **99** 307-311. * These authors contributed equally to this work. (本論文第 4 章)

学会発表

国際学会発表

- 1.) **Makoto Abe**, Hitoshi Suzuki, Hironori Nishitsuji, Hisatoshi Shida and Hiroshi Takaku. Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing. The 15th International Congress of Virology. September, 2011. Sapporo, Japan.

国内学会発表

- 1.) **阿部 真**, 鈴木 等, 西辻 裕紀, 志田 壽利, 高久 洋. HTLV-1 Rexタンパク質とDicerの相互作用によるRNAiの抑制. 第12回日本RNA学会年会 2010年7月 東京
- 2.) **阿部 真**, 西辻 裕紀, 谷口 善則, 渡邊 宇裕, 高久 洋. BST-2の抗HIV-1活性に関するcofactorの検索. 第25回日本エイズ学会学術集会 2011年11月 東京
- 3.) **阿部 真**, 西辻 裕紀, 谷口 善則, 渡邊 宇裕, 高久 洋. BST-2の抗HIV-1活性に関する宿主因子の探索. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月 大阪
- 4.) Leila Sawada, 西辻 裕紀, **阿部 真**, 高久 洋. ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription. 第60回日本ウイルス学会学術集会 2012年11月 大阪
- 5.) Leila Sawada, Hironori Nishitsuji, Makoto Abe, Hiroshi Takaku. ZBRK1 represses HIV-1 LTR-mediated transcription. 第23回抗ウイルス療法研究会総会 2013年6月 東京
- 6.) **阿部 真**, 西辻 裕紀, 谷口 善則, 渡邊 宇裕, 高久 洋. BST-2の抗HIV-1活性におけるATP1B3の影響. 第61回日本ウイルス学会学術集会 2013年11月 神戸
- 7.) 長沼 晴樹, 杉山 隆一, **阿部 真**, 西辻 裕紀, 小関 寛, 村上 優子, 武内 寛明, 高久

洋. HSP70 誘導剤Prostaglandin A₁による新規抗HIV-1 複製抑制機構の解明. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 神戸

- 8.) Leila Sawada, 西辻 裕紀, 阿部 真, 高久 洋. Evaluation and identification of KRAB-Zinc finger protein influence on HIV-1 gene expression. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 2013 年 11 月 神戸

受賞等

- 1.) 独立行政法人 日本学生支援機構 第一種奨学金「特に優れた業績による返還免除」: 半額免除

8. 謝辞

本研究を行うにあたり熱心なご指導とご教示を頂きました，本大学 工学部 生命環境科学科 高久 洋 教授に深く感謝致します。

また，様々な面でご支援を頂きました，本大学 工学部 生命環境科学科 黒崎 直子 教授，並びに同 橋本 香保子 准教授に深く感謝致します。

さらに，HTLV-1 Rex と Dicer の相互作用による RNAi silencing の抑制に関する研究を共同研究して頂きました，北海道大学 遺伝子病制御研究所 感染症態分野 志田 壽利 教授，PGA1 による APOBEC3G 依存的な HIV-1 複製抑制に関する研究を共同研究して頂きました 東京医科歯科大学 歯学総合研究科 ウイルス制御学分野 武内 寛明 助教に深く感謝致します。

レンチウイルスベクターシステムを分与して頂きました，独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター 細胞運命情報解析技術開発サブチーム 三好 浩之 博士，pNFLAG-Bosを分与して頂きました，金沢大学 がん研究所 免疫炎症制御研究分野 須田 貴司 教授，pNL4-3lucΔenvを分与して頂きました，カリフォルニア大学ロサンゼルス校 I.S.Y. chen博士に深く感謝致します。

学位申請にあたり本論文を審査して頂きました，本大学 工学部 生命環境科学科 河合 剛太 教授，同 滝口 泰之 教授，同 黒崎 直子 教授，並びに東京医科歯科大学 大学院歯学総合研究科 神奈木 真理 教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり直接ご指導を賜り多くの知識と有用なご助言を頂きました，本大学 西辻 裕紀 博士研究員，鈴木 等 博士，並びに杉山 隆一 博士に深く感謝致します。

また，本研究を行うにあたりご協力頂きました遺伝子治療学・生体防御学研究室の皆様にも深く感謝致します。

最後に，大学院博士後期課程まで長い期間に渡り学ぶ機会を与えて頂きましたと共に，本研究を行うにあたり終始温かく見守って下さった家族に心より感謝致します。