

課題番号 : 25指108
研究課題名 : DNA 損傷によって増加するマクロファージへの HIV-1 感染機序の解明と応用
主任研究者名 : 石坂幸人
分担研究者名 : なし
キーワード : HIV-1、インテグラーゼ、マクロファージ、DNA 損傷、新規抗エイズ薬
研究成果 :

1 : インテグラーゼの DNA 損傷部へのリクルートメントに関与する宿主細胞側因子の同定

[背景] 先行研究で、HIV-1 インテグラーゼが不活化された状態でも、低い頻度ながら感染性を示すことや、このインテグラーゼ活性非依存的なウィルス感染は特に静止マクロファージにおいて、DNA 損傷で促進されることが報告された。また、HIV-DNA は DNA 二重鎖切断 (DSB: DNA double-strands break) 部位へ挿入されることも明らかとなっている (Koyama *et al.* 2013)。本研究では、DSB 誘導活性を示す HIV 蛋白質である Vpr が、どのような機序で静止マクロファージへのウィルス感染に関与するのかについて、DSB 誘導機序から理解する。

[結果] A. インテグラーゼ結合タンパクの同定: 当研究室で樹立したインテグラーゼ発現誘導細胞を用いて、インテグラーゼに結合性を示す宿主側因子の同定を試みた。まず、①インテグラーゼに付加した FLAG タグに対する抗体による精製、並びに、②インテグラーゼに対する抗体を用いた 2 段階精製の二種類のアプローチで、結合蛋白質の同定を試みた (図 1-A)。しかし、抗インテグラーゼ抗体による精製と抗原ペプチドによる競合溶出を行ったところ、大部分は抗原ペプチド存在下においてもビーズ上に結合したまま保持された。これは使用した抗インテグラーゼ抗体がポリクローナル抗体であるため、抗原ペプチドの添加では抗体に結合したインテグラーゼを全て遊離することができないためであると考えられた。そこで、現在、抗原ペプチドによるアフィニティー精製後のインテグラーゼ抗体を調整中である。今後、この精製抗体を用いて、インテグラーゼ結合タンパクの同定の準備を行う。**B.** インテグラーゼの DSB 部位への集積: 図 1B 上図は、ホーミングエンドヌクレアーゼである *I-PpoI* により *DABI* 遺伝子座位を切断した際の、インテグラーゼの同 DSB 部位へのリクルートを ChIP アッセイで評価した結果を示す。EGFP-IN と Cherry-LacR-Vpr を用いた FRAP 法を用いた解析により Vpr 存在下においてインテグラーゼが Micro-irradiation により誘導した DSB 部位へと迅速に集積することが明らかとなった (図 1B 下図)。

2 : Vpr と Topo-I の機能的関連性の証明

[背景] Vpr を培養細胞で発現させると、DNA 二重鎖切断が誘導される。しかし、Vpr 自身にはヌクレアーゼ活性が無いことから、宿主蛋白質機能を介して DSB を誘導していることが示唆される。一方、昨年度の解析で、Vpr 結合因子として、DNA のトポロジーを変化させる Topoisomerase1 (以下 Topo1) を同定し、両者が直接的に結合することや、Topo1 の発現をのウィルス感染における意義を解析した。

[結果] A. HIV 感染者の中には、感染後長期間に亘ってエイズを発症しない、所謂、Long-term non-progressor (LTNP) が認められる。LTNP の一つの原因として、Vpr の 77 番目のアルギニンがグルタミンに変異した R77Q 変異ウィルスの関与が報告されている。今回の解析で、R77Q 変異体 Vpr (Vpr/R77Q) は Topo1 との結合性を示さないこと、また、Vpr/R77Q を細胞に発現させた場合、DSB 自体の生成は野生型 Vpr と同程度に認められるが、野生型 Vpr と比較して DSB シグナルの誘発が低下することを認めた。即ち、Vpr は Topo1 非依存的に DSB 自身を誘導していることが示唆された。**B.** Topo1 の HIV 感染における役割: Topo1 に対する siRNA 導入下でのウィルス感染効率を評価した結果、有意に感染効率が減少した (図 2 右図)。また、Vpr による DSB 誘発に伴って惹起される Topo1 の分解に関与する宿主側因子を siRNA を用いて抑制すると、顕著なウィルス感染効率の低下が認められた。即ち、Vpr/Topo1 を介した DSB 誘導はウィルス感染において重要な役割を示す持つことが強く示唆された。

Subject No. : 25A108
Title : The mechanism of DNA damage induced HIV-1 infection and its application
Researchers : Yukihito Ishizaka
Key word : HIV-1, Integrase, Macrophage, DNA damage, novel AIDS drug
Abstract :

1. Identification of cellular factor(s) which involved in recruitment of IN to DSB site.

[Background] We focus on the mechanism of integrase (IN) catalytic activity independent HIV infection, which is stimulated by DNA damage induction. Previously, we reported that proviral DNA integrated at site of DNA double strand break (DSB site), implying that the cellular machinery directing HIV DNA to the DSB sites. Here, we decided to identify the cellular factor(s) regulating the recruitment of HIV DNA at DNA damage site. The finding from this study will provide the novel target for anti-HIV drug development.

[Results] A. To identify the DNA damage induced IN associating factors, we first performed anti-FLAG purification in which FLAG tag is added to IN of its Dox inducible cell line. Secondary, tandem purification with anti-IN antibody (Ab) was conducted to reduce the non-specific association. However, the use of polyclonal Ab to IN hampered recovery of anti-IN Ab bound proteins through IN-peptide competitive elution. Thus, we are now preparing the IN-peptide affinity purified antibody for tandem purification of IN associated factors. **B.** Utilizing the FRAP (Fluorescence recovery after photo-bleaching) method with EGFP-IN and Cherry-LacR-Vpr, we found that IN was quickly accumulated to the micro-irradiation created DSB tracks in a Vpr dependent manner. Data suggested that Vpr promoted quick recruitment of IN to DSB site.

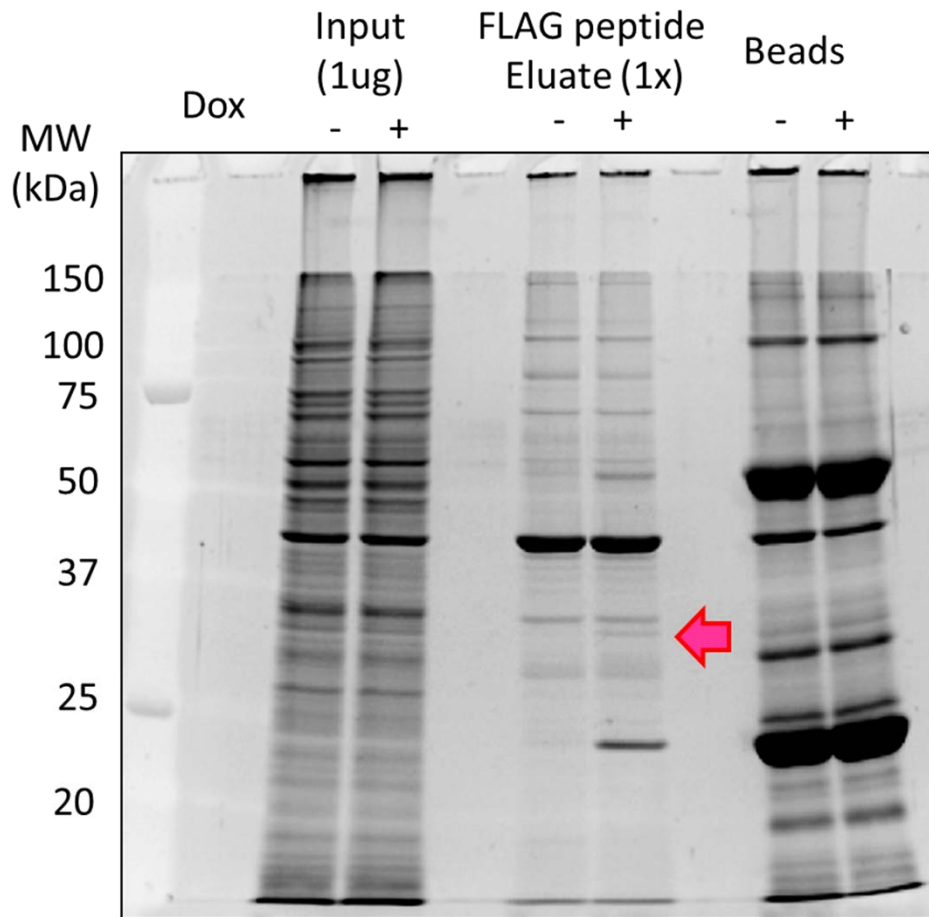
2. Functional association of Vpr and Topo1

[Background] Vpr induces DSB on cellular genomic DNA. Because Vpr protein itself has no nuclease activity, it is plausible that Vpr induced DSB depends on the cellular machinery. We identified Topoisomerase1 (Topo1), which induces the topological changes on dsDNA, as a novel Vpr associating factor. We found that Vpr directly associated with Topo1, and significant decrease of Vpr induced DSB under the Topo1 downregulated condition. Here we investigated role of Topo1 for viral integration.

[Results] A. By analyzing the mode of association between Vpr and Topo1, we identified that Vpr/R77Q mutant, the mutation of which was identified in virus in long term non-progressor of HIV-positive patients, did not bind Topo1. Although the similar level of DSB was observed in cells that expressed Vpr/R77Q and wild-type Vpr, Vpr/R77Q was less potent for triggering cellular DSB signals. Data suggest that Vpr induces DSB in Topo1-association independent manner. **B.** For investigating the importance of Topo1-Vpr interaction on HIV infection, we analyzed the viral infectivity with siRNA application. By downregulation of Topo1 and Topo1-induced DSB signal associated factors, the viral infectivity was significantly reduced, strongly suggesting the critical role of Topo1 mediated Vpr-induced DSB on the viral infection.

図1.インテグラーゼのDNA損傷部へのリクルートメントに関する 宿主細胞側遺伝子産物の同定

A. IN結合タンパクの解析 (FLAG-IN αFLAG-Ab 精製泳動像)



← : FLAG-IN

B. INはDSB部位に集積する (ChIP assay: 上, Microirradiation: 下)

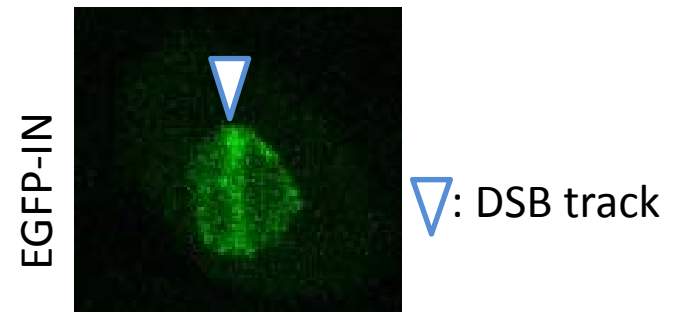
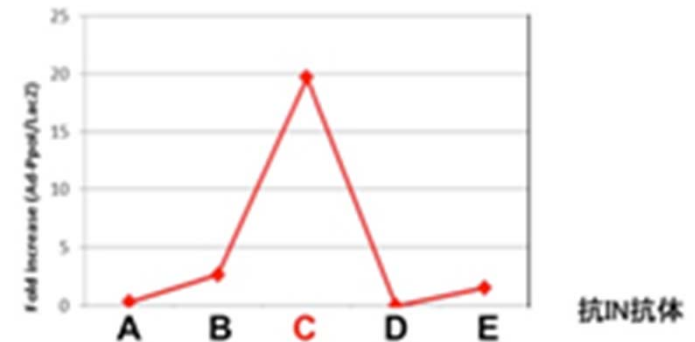
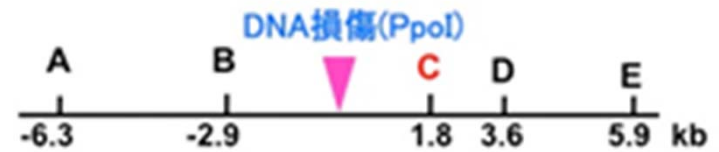
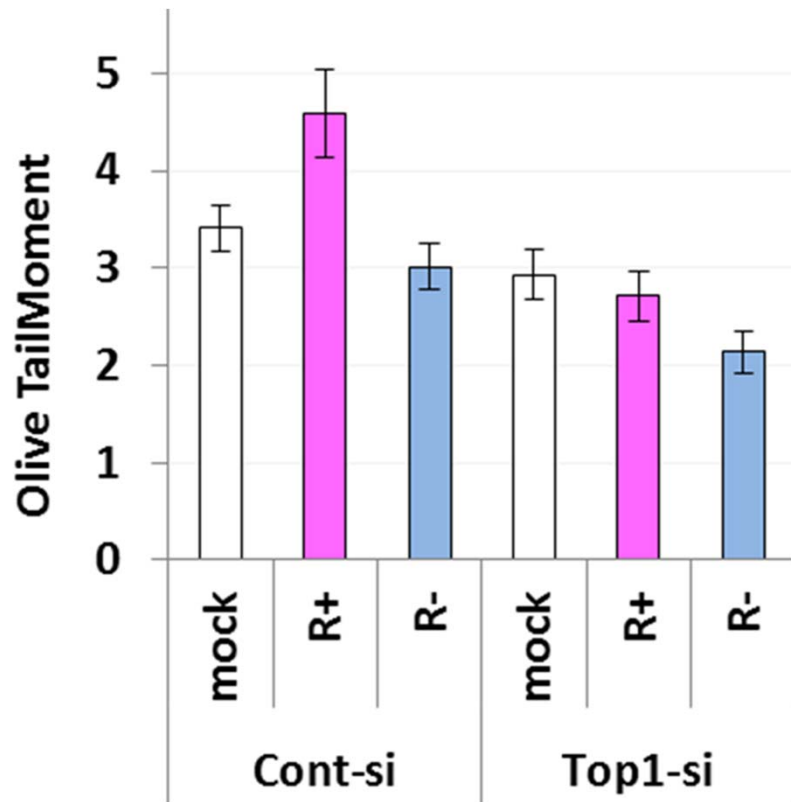
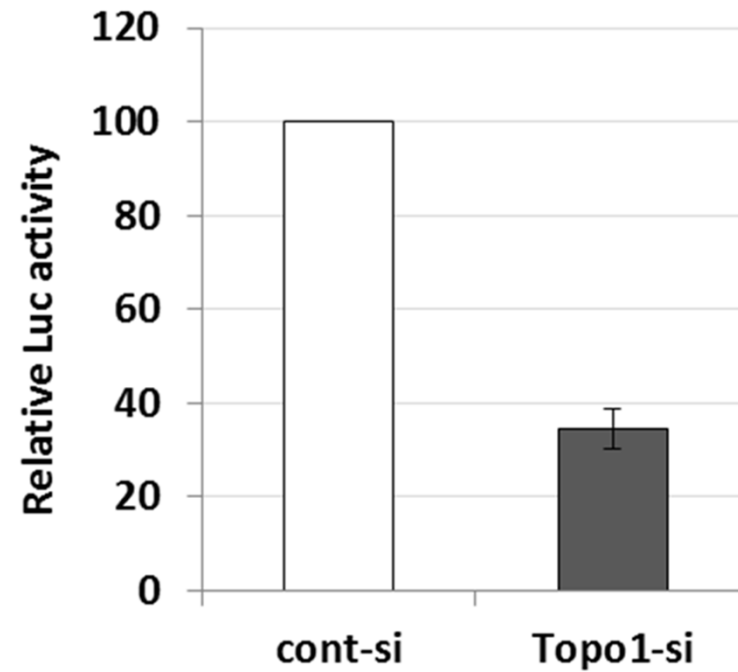


図2. VprとTopo-Iの機能的関連性の証明

A. Topo1はVpr(+)
ウイルス感染時の
DSB誘導に要求される
(Neutral Comet assay)



B. Topo1はHIV感染に重要である
(Luciferase assay)



研究発表及び特許取得報告について

課題番号：25指108

研究課題名：膠原病における、ACE2阻害病態の分析と治療法開発、および抗GABA受容体抗体による診断法の開発

主任研究者名：石坂 幸人

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Identification of novel autoantibodies to GABAB receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus.	Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Kano T, Ishizaka Y, Akio Mimori A	Rheumatolog	53:1219-28	2014
Human immunodeficiency virus type 1 Vpr increases hepatitis C virus RNA replication in cell culture.	Deng A, Chen C, Ishizaka Y, Chen X, Sun B, Yang R.	Virus Res.	184:93-102	2014
HIV-1 Vpr accelerates viral replication during acute infection by exploiting proliferating CD4+ T cells in vivo.	3. Sato K, Misawa N, Iwami S, Satou Y, Matsuoka M, Ishizaka Y, Ito M, Aihara K, An D-S, Koyanagi Y.	PloS Pathogen,	9:e1003812	2013
Retrotransposition of long interspersed element-1 in the kidney by human immunodeficiency virus type-1 Vpr.	Iijima K, Okudaira N, Tamura M, Saito Y, Shimura M, Goto M, Matsunaga A, Hoshino S, Kano S, Hagiwara S, Tanuma J, Gatanaga H, Baba M, Iguchi T, Yanagita M, Oka S, Okamura T and Ishizaka Y.	Retrovirology	0.474305556	2013
DNA damage aids human immunodeficiency virus type 1 infection by overcoming integrase inhibition.	Koyama T, Sun B, Tokunaga K, Tatsumi M and Ishizaka Y.	Retrovirology	10:21	2013
DNA methylation profiling can classify HIV-associated lymphomas.	Matsunaga A, Hishima T, Tanaka N, Yamazaki M, Mochizuki M, Tanuma J, Oka S, Ishizaka Y, Shimura M and Hagiwara S.	AIDS	28:503-10,	2013

研究発表及び特許取得報告について

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
The functional analysis of DNA damage induced LINE-1 retrotranspositon	飯島健太、石坂幸人	第29回放生研・放医研国際シンポジウム	コープイン京都	2013, 11/28
レトロトランスポジションの制御異常による疾病の発症	石坂幸人、岡村匡史	第36回阿蘇シンポジウム	熊本	2013/8/3

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
該当なし				

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
該当なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。