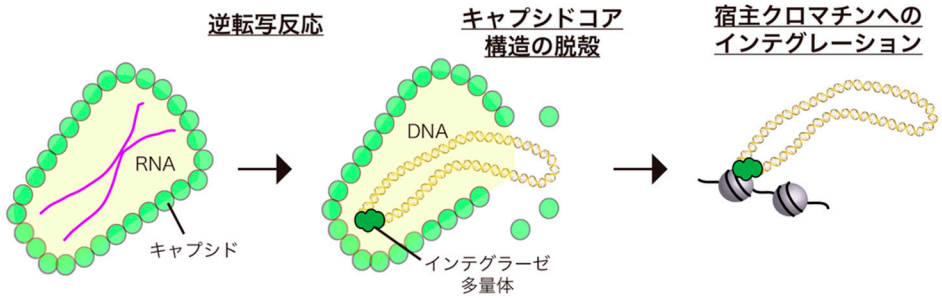
134　クライオ電子顕微鏡を用いたHIV複製メカニズムの解析	町田　晋一

【目的】本研究の目的は、HIV 感染プロセスー特に、ウイルス膜とヒト細胞膜の融合から始まり、キャプシドコア内のウイルス RNA の逆転写、二本鎖 DNA への変換、さらにウイルス DNA が宿主クロマチンに組み込まれるまでの過程ーの分子機構を明らかにすることである。これらの反応は抗 HIV 治療の重要なターゲットであり、その深い理解は新たな治療戦略開発に必須である。しかし、これらの過程は完全には解明されていないため、本研究では細胞生物学的手法、生化学的手法、構造生物学的手法により、HIV 逆転写反応からインテグレーションに至るまでの詳細なメカニズムを解析することを目指した。

【方法】宿主エピゲノム機構を利用した HIV-1 複製機構の解明のために、HIV-1 のエピゲノム制御因子を Proteomics of isolated chromatin segments（PICh）法および siRNA スクリーニングにより同定した。さらに、細胞生物学的および生化学的手法により、HIV-1 ゲノムに形成されるエピゲノム動態を解析した。また、HIV-1 複製反応、特に逆転写反応を時空間的に解析するために、高効率の無細胞 HIV-1 逆転写反応系の構築を行った。さらに、逆転写反応の場となるキャプシド複合体のクライオ電子顕微鏡解析を実施した。

【結果】PICh 法および siRNA スクリーニングにより、POLE3 を HIV-1 のエピゲノム制御因子として同定した。また、POLE3 はインテグレーション前の HIV-1 DNA に集積し、そのサイレンシングに機能することで、宿主ゲノムへの HIV-1 DNA の取り込みを担保し、HIV-1 複製を効率的に進行させる因子であることを明らかにした。一方で、HIV-1 の逆転写反応を時空間的に解析するために、高効率の無細胞 HIV-1 逆転写反応系を構築した。また、qPCR 法により、逆転写反応の各ステップにおける産物を検出し、その時間情報を得ることに成功した。さらに、逆転写反応の場となるキャプシド複合体のクライオ電子顕微鏡解析を行い、HIV-1 キャプシド複合体に関する構造解析基盤を構築した。構築した無細胞 HIV-1 逆転写反応系に本構造解析技術を適用することで、逆転写反応中の HIV-1 キャプシド複合体に関する空間情報を取得できることが期待される。

HIV-1 複製メカニズムの解明



ー宿主エピゲノム機構を利用したHIV-1複製機構の解明
（細胞生物学的手法、生化学的手法）
ー無細胞HIV-1複製システムによるHIV-1複製の時空間的解明
（構造生物学的手法、生化学的手法）

134. クライオ電子顕微鏡を用いたHIV複製メカニズムの解析

町田　晋一

国立国際医療研究センター 研究所 ウイルス構造機能研究部

Key words : HIV，キャプシド，インテグラーゼ，無細胞逆転写反応システム，クライオ電子顕微鏡解析

緒　言

多剤併用療法（cART）は、HIV 感染者におけるエイズ発症を抑制することを可能にしたが、ウイルスを体内から完全に排除するという根本的治癒には至っていない。また、効果的なHIV-1 ワクチンの開発が実現されていないため、HIV 感染者は生涯にわたって抗HIV 薬の使用が必要となる。そのため、治療薬の副作用や薬剤耐性ウイルスの出現といった課題が存在する。これらの問題を解決し、さらに効果的な抗HIV 治療を開発するためには、HIV の複製メカニズムの詳細な解明が不可欠である。

HIV 感染は、ウイルス膜とヒト細胞膜の融合を通じて始まり、この過程でウイルスのキャプシドコア粒子が細胞質内に放出される。キャプシドコア内に保持されているウイルスRNA は、コア内で逆転写され、二本鎖の直鎖状DNA が生成される。この逆転写反応後、キャプシドコア内に存在する HIV インテグラーゼや宿主由来のタンパク質がウイルス DNA と結合し、キャプシドコアの崩壊と共にウイルス DNA が宿主クロマチンに組み込まれる。これらの反応は、抗 HIV 治療の重要なターゲットであり、そのメカニズムの深い理解が、新しい抗 HIV 治療戦略の開発に不可欠である。しかしながら、これらのプロセスについては、まだ完全には理解されておらず、さらなる研究が求められている。

そこで本研究では、細胞生物学的手法、生化学的手法、構造生物学的手法を駆使し、HIV 逆転写反応からインテグレーションまでの過程の分子機構の詳細を解明することを目指した。その結果、宿主エピゲノム機構を利用した HIV-1 複製機構を解明した［1］。また、HIV 複製反応の時空間的な解析を可能とする無細胞HIV-1 逆転写反応システムの構築に成功した。

方法および結果

1. 宿主エピゲノム機構を利用したHIV-1 複製メカニズムの解明

我々は、新たに合成されたHIV-1 DNA（unintegrated HIV-1 DNA）がエピジェネティックな制御を受けてサイレンシングされ、インテグレーションによって HIV-1 の発現が促進されるメカニズムを解明した［2］。しかし、unintegrated HIV-1 DNA のサイレンシングがHIV-1 の複製にどのように影響するかは、不明なままであった。この問いに答えるため、我々はProteomics of isolated chromatin segments（PICh）法を使用して、unintegrated HIV-1 DNA に結合するタンパク質を網羅的に同定し、siRNA スクリーニングを介してそのサイレンシングに関与するキーファクターとして POLE3 を同定した。さらに、POLE3 の機能を細胞生物学的及び生化学的に解析することで、この因子が unintegrated HIV-1 DNA 上でのエピジェネティックな制御による転写レベルのサイレンシングに寄与していることが明らかになった（図 1）。一方で、プラスミドDNA を用いた解析により、POLE3 は外来のDNA を非特異的にサイレンシングするわけではなく、逆転写反応により合成されたHIV-1 DNA を特異的にサイレンシングすることも明らかになった。次に、POLE3 の欠損がHIV-1 の複製に与える影響を解明するために、POLE3 を欠損させた細胞でHIV-1 の複製を長期間観察した（図 2）。これにより、POLE3 の欠損が HIV-1 複製の劇的な抑制につながることが明らかになった。これらの結果から、POLE3 はunintegrated HIV-1 DNA のサイレンシングに重要な役割を果たし、そのサイレンシングの欠如がHIV 複製を阻害する可能性があることを示した［1］。

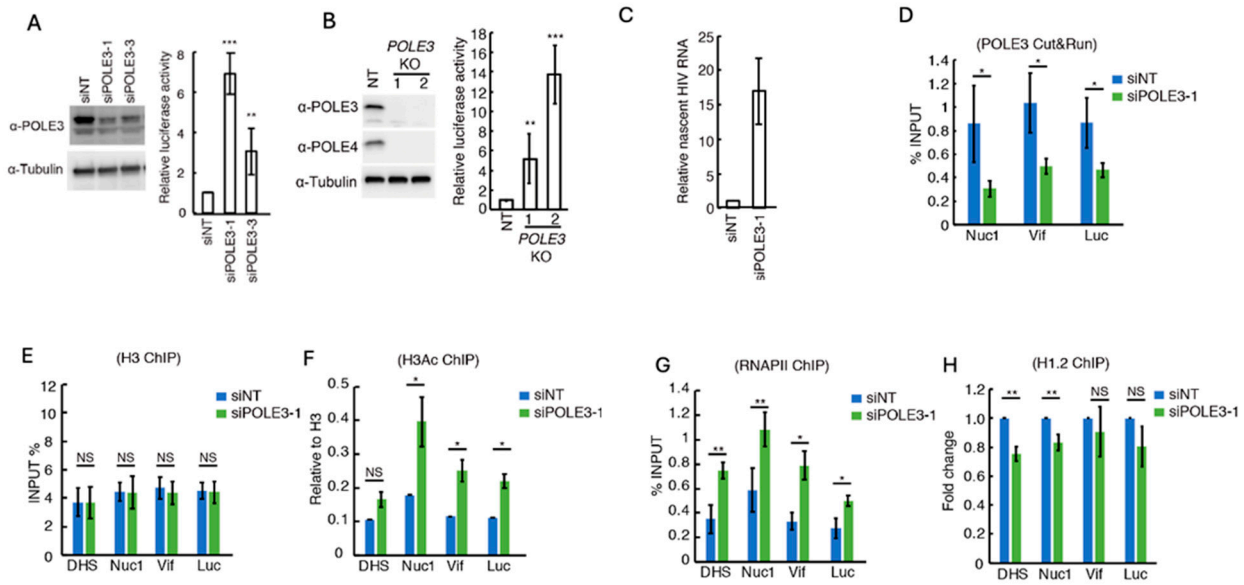


図 1. POLE3 は unintegrated HIV-1 DNA のサイレンシング因子として機能する

A) POLE3 をノックダウンした Hela 細胞に HIV-1-Luciferase IND116A を感染させ、unintegrated HIV-1 DNA からの発現を Luciferase assay により評価した。

B) POLE3 をノックアウトした Hela 細胞に HIV-1-Luciferase IND116A を感染させ、unintegrated HIV-1 DNA からの発現を Luciferase assay により評価した。

C) POLE3 をノックダウンした Hela 細胞に HIV-1-Luciferase IND116A を感染させ、unintegrated HIV-1 DNA からの転写を RNA-IP 法により評価した。

D) POLE3 をノックダウンした Hela 細胞に HIV-1-Luciferase IND116A を感染させ、Cut&Run 法により POLE3 の HIV-1 DNA 上への集積を評価した。

E～H) POLE3 をノックダウンした Hela 細胞に HIV-1-Luciferase IND116A を感染させ、ChIP 法により HIV-1 DNA 上のエピゲノムを評価した。

*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001（independent Student's t test）。NS : not significant。

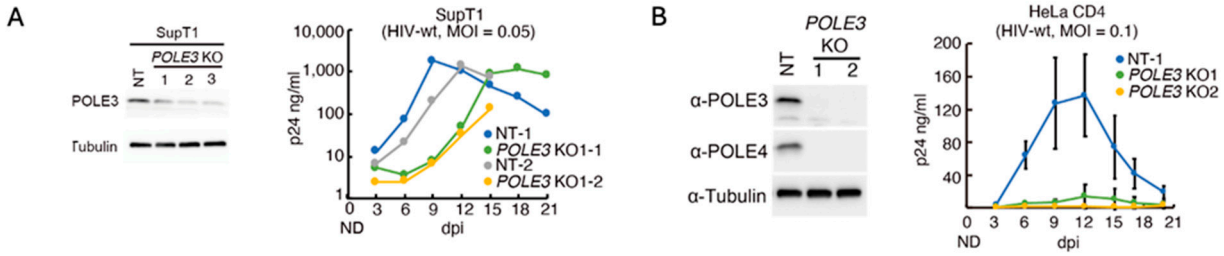


図 2. POLE3 欠損は HIV-1 複製を阻害する

A) POLE3 をノックダウンした Jurkat 細胞に HIV-1 を感染させ、P24 の量を ELISA 法により測定することで、HIV-1 複製を評価した。

B) POLE3 をノックアウトした HeLaP4 細胞（CD4 陽性）に HIV-1 を感染させ、P24 の量を ELISA 法により測定することで、HIV-1 複製を評価した。

2. 無細胞 HIV-1 逆転写反応システムの構築とその時空間的解析系の構築

無細胞 HIV-1 逆転写反応システムによる HIV-1 複製反応の時空間的解析のために、高純度に精製した HIV-1 粒子の大量調製系を確立した。具体的には、293T 細胞にて産生した HIV-1 粒子をプロテアーゼ処理することでウイルス外タンパク質を分解したのちに、ショ糖クッション遠心法を用いて高純度の HIV-1 粒子を精製した。さらに、ハチ毒主成分であるメリチンを用いて穏やかに HIV-1 粒子を透過処理したのち、IP6 及び dNTPs を添加することで、無細胞逆転写反応を試験管内にて誘導することに成功した。確立した無細胞 HIV-1 逆転写反応では、逆転写反応産物は時間とともに増加し、細胞内での HIV 複製にて観察されるタイミングに一致する時間順序で観察された。一方で、逆転写反応阻害剤 Nevirapine（NVP）存在下で反応を行った場合、逆転写反応産物はバックグラウンドレベルまで減少した。また、これまでの試験管内にて構築された逆転写反応系では、ERT（逆転写初期反応産物）は高効率で産出されるが、LRT（逆転写後期反応産物）はごく僅かしか産出されないことが知られている。一方、本研究では、ERT に対して 30～50%の LRT が観察され、極めて高効率な無細胞逆転写反応システムの構築に成功したと言える。一方で、逆転写反応後に形成される HIV-1 cDNA-integrase 複合体（pre-integration complex）に関して、構造解析に向けた大量調製系（ml オーダーの大容量無細胞逆転写反応系とそこで構成される複合体の大量精製系）を確立した。具体的には、確立した高効率の HIV-1 逆転写反応システムにより、逆転写後に構成される pre-integration complex を再構成し、ショ糖密度勾配遠心法により pre-integration complex を精製する系を構築した。

一方で、無細胞 HIV-1 逆転写反応の時空間的解析に必須となるクライオ電子顕微鏡解析基盤の構築を進めた。特に、逆転写反応の反応場を構築する HIV-1 キャプシドを用いて、基本構成単位（キャプシド六量体）およびキャプシド格子を再構成し、そのクライオ電子顕微鏡解析をおこなった（図 3）。

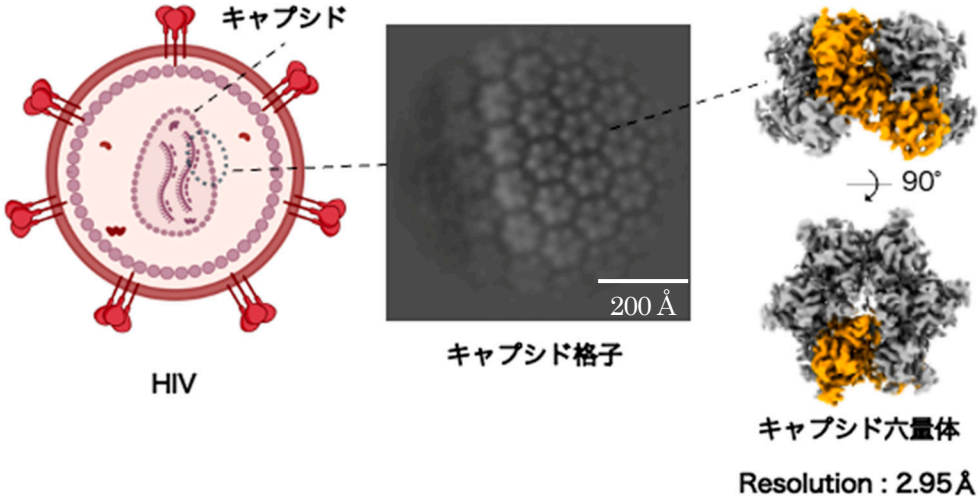


図 3. HIV-1 キャプシド複合体の構造解析
再構成 HIV-1 キャプシドを用いたキャプシド基本構成単位（キャプシド六量体）およびキャプシド格子のクライオ電子顕微鏡解析。

考　察

1. 宿主エピゲノム機構を利用した HIV-1 複製メカニズムの解明

本研究により、HIV-1 unintegrated DNA（uinDNA）のサイレンシング因子として POLE3 を同定した。また、POLE3 が HIV-1 uinDNA に集積し、転写レベルで HIV-1 uinDNA のサイレンシングに寄与することが明らかになった。一方で、別の研究グループにより、HIV uinDNA のサイレンシング因子として SMC5-6 複合体および CAF1 複合体が同定された［3，4］。我々の研究では、SMC5-6 複合体および CAF1 複合体に対しても POLE3 と同様の解析を行い、これ

らの複合体が外来 DNA を非特異的にサイレンシングすることを明らかにした。しかし、POLE3 は逆転写後に生成された新規の HIV-1 uinDNA を特異的にサイレンシングする。この結果は、HIV-1 uinDNA への結合に関与する宿主／HIV 由来のタンパク質群や HIV-1 DNA 自体の構造が POLE3 の集積に重要であることを示唆している。

POLE3 を欠損させた細胞を用いた HIV-1 の複製サイクル解析により、POLE3 が HIV-1 複製サイクルにおいて必要不可欠であることが示された。一方で、POLE3 を欠損させた細胞から産生される HIV-1 virion は正常に成熟し、その感染性が維持されていることから、POLE3 による HIV-1 uinDNA のサイレンシングが HIV-1 複製サイクルにおいて重要であることが示唆された。これらの結果は、POLE3 による HIV-1 uinDNA の特異的なサイレンシングが HIV-1 の複製に必要であることを示す。

2. 無細胞 HIV-1 逆転写反応システムの構築とその時空間的解析系の構築

本研究により、HIV-1 粒子を用いた高効率の無細胞 HIV-1 逆転写反応システムを構築した。また、逆転写反応の反応場を構築する HIV-1 キャプシドに関するクライオ電子顕微鏡解析基盤を構築した。今後はこれら技術を組み合わせ、HIV-1 粒子を用いた HIV-1 逆転写反応の時空間的解析が可能となり、未だ不明である HIV-1 逆転写反応中のキャプシド構造動態の詳細を解明することが期待できる。また、本解析にて、逆転写反応後に形成される HIV-1 cDNA-integrase 複合体（pre-integration complex）の大量調製と精製に成功している。本複合体に関しても、クライオ電子顕微鏡解析により、ウイルス粒子中で構成される pre-integration complex の構造解明が期待できる。

共同研究者・謝辞

「宿主エピゲノム機構を利用した HIV-1 複製メカニズムの解明」に関する共同研究者は、Institute of human genetics（CNRS、France）の MONFES BENKIRANE 博士、SUZIE THENIN-HOUSSIER 博士、CYPRIEN JAHAN 氏、LUCIE BONNET-MADIN 氏、SCARLETTE ABBOU 氏、HENG-CHANG CHEN 博士である。

「HIV-1 キャプシドのクライオ電子顕微鏡解析」に関する共同研究者は、北海道大学大学院薬学研究院生体分子機能学研究室の前仲勝実博士である。

本研究は、公益財団法人上原記念生命科学財団からのご支援のもと遂行した。厚く御礼申し上げます。

文　献

1） Thenin-Houssier S, Machida S（共同第一著者）, Jahan C, Bonnet-Madin L, Abbou S, Chen HC, Tesfaye R, Cuvier O, Cuvier O, Benkirane M. POLE3 is a repressor of unintegrated linear HIV-1 DNA required for efficient virus integration and escape from innate immune sensing. *Science advances* 9, eadh3642 (2023) PMID: 37922361 DOI: 10.1126/sciadv.adh3642

2） Machida S（＊共責任著者）, Depierre D, Chen HC, Thenin-Houssier S, Petitjean G, Doyen CM, Takaku M, Cuvier O, Benkirane M.Exploring histone loading on HIV DNA reveals a dynamic nucleosome positioning between unintegrated and integrated viral genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 117, 6822-6830 (2020) PMID: 32161134 DOI: 10.1073/pnas.1913754117

3） F. K. Geis, Y. Sabo, X. Chen, Y. Li, C. Lu, S. P. Goff, CHAF1A/B mediate silencing of unintegrated HIV-1 DNAs early in infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2116735119 (2022). PMID: 35074917 DOI: 10.1073/pnas.2116735119

4） L. Dupont, S. Bloor, J. C. Williamson, S. M. Cuesta, R. Shah, A. Teixeira-Silva, A. Naamati, E. J. D. Greenwood, S. G. Sarafianos, N. J. Matheson, P. J. Lehner, The SMC5/6 complex compacts and silences unintegrated HIV-1 DNA and is antagonized by Vpr. *Cell Host Microbe* 29, 792–805.e6 (2021) PMID: 33811831 DOI: 10.1016/j.chom.2021.03.001