

研究報告書

「HIV-1 転写伸長を制御する non-coding RNA の機能解析」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：水谷 壮利

1, 研究のねらい

HIV-1 は潜伏感染することで抗ウイルス薬、宿主の免疫学的排除から逃れることが知られている。HIV-1 の潜伏感染において特徴的なのは、HIV-1 の転写伸長が不完全に停止して生じたと考えられる短鎖の RNA が、潜伏感染化 T 細胞において検出される点にある。本研究ではこの短鎖 RNA の HIV の潜伏感染における存在意義を明らかにし、その分子機構を明らかにすることを目指とともに短鎖 RNA の生合成機構を明らかにすることで HIV-1 潜伏感染化のメカニズムの解明を目指した。

2, 研究成果

現在のAIDS治療において、抗レトロウイルス薬のカクテル療法（多剤併用療法）が非常に有効であり、AIDSはかつての不治の病から、治癒も可能な生涯付き合い続ける病気へと変わりつつある。多剤併用療法の処方により、血液中のウイルス量は検出限界以下となり、処方から二、三年で体内から完全にウイルスを除外できると当初は試算されたが、そのとおりにとはならなかった。原因は患者体内にはウイルスが活発に増殖するとされる活性型のCD4陽性T細胞以外にもウイルスが存在し続けることができる細胞があるからである。それらはウイルスを産生していない潜伏感染化状態にあり、薬剤や、免疫細胞が到達しにくいことが考えられた。HIV-1はCD4陽性T細胞やマクロファージ以外にも、免疫担当細胞が手を出せない、サンクチュアリともいわれる脳や精巣、網膜といった場所にもウイルスが存在し続けると考えられている。AIDS感染症を考える上で潜伏感染化ウイルスをどのように扱っていくかが重要である。そこで本研究ではHIVの潜伏感染に関与する宿主因子およびそのクロマチン環境を明らかにすることでHIVの潜伏感染化の分子機構の解明を試みた。

①Brm型SWI/SNF複合体はHIV-1 の転写伸張を正に制御する。

HIV-1 の LTR を備えたウイルスベクターを種々のがん細胞株に導入し、クローニングを行い、感染クローンの個々の発現レベルについて GFP を指標に解析した結果、HIV-1 ベクターは Brm を欠失した細胞株で際だってその発現が抑制を受けやすいことを見いだした。GFP の発現抑制を受けたクローンの HIV-1 ベクターの mRNA を調べてみると、転写は開始しているものの、転写伸張レベルが律速となっていることを明らかにした。HIV-1 の転写開始点直下にはヌクレオソームが形成されること

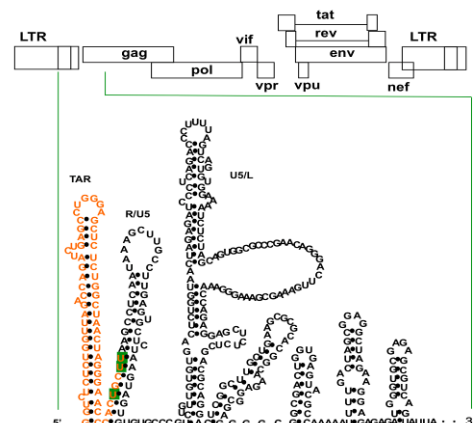


図1 HIV-1 RNA構造予想図とshort transcript (赤)

が知られているが、Brm 型 SWI/SNF 複合体はこのヌクレオソームの弛緩に必要であることを明らかにした。興味深い点として、Brm タンパク質は、HIV-1 が潜伏感染するとされる、静止期の T 細胞株においてその発現レベルが減弱していることを示し、Brm 型 SWI/SNF 複合体の枯渇という細胞内環境の変遷が HIV-1 の潜伏感染化に分子機構に寄与していることが考えられた。一方、Brm 欠失細胞株で見られた発現抑制を受けた HIV-1 の中途転写停止の mRNA の停止位置はおよそ 60 nt であり、これは転写開始点直後に形成されるトランスアクチベーターである Tat タンパク質の結合部位である TAR のステムループが終わる部位近傍であることを RNase Protection assay 法により、明らかにした(図 1)。

②HEXIM1-7SK 複合体による HIV-1 short transcriptの生合成機構の解析

次に DNA から読み出された RNA は多くの RNA 結合性の核内宿主因子によって転写伸張およびスプライシング等の制御を受けることが知られている。HIV-1 は潜伏感染時に 60 nt ほど short transcript を作り、転写停止していることから潜伏感染化の律速段階は転写伸張レベルにあると考え、RNA 結合性の転写制御因子の存在を仮定し、その同定を進めた。この結果、hnRNP A1 依存的に HEXIM1-7SK 複合体が転写開始直後の short transcript を介してプロモーターに動員されることを明らかにした。HEXIM1-7SK 複合体は RNA Polymerase II の CTD のリン酸化の kinase である P-TEFb と結合することでその kinase 活性を不活化することが既に知られているが、本研究ではさらに転写伸張因子である TFIIS (TCEA1/2) は HEXIM1 と相互作用し、HEXIM1-7SK 複合体によって不活化される証拠を得た。RNA Polymerase II は RNA 合成中に塩基の取り込み異常などが起きた時に転写を停止し、10 塩基ほど 5' 側に戻る現象が知られており (back track)、この時に TFIIS は 3' 側の新生 RNA 鎖を切り出し、転写を再開させる機能があることが報告されている。そこで short transcript を後述する方法にて増幅し、その配列を次世代シーケンサーにて解析を行った。その結果、short transcript は 60 塩基を中心としたおよそ 50 塩基から 70 塩基で停止していること(図 2)を明らかにすると同時に

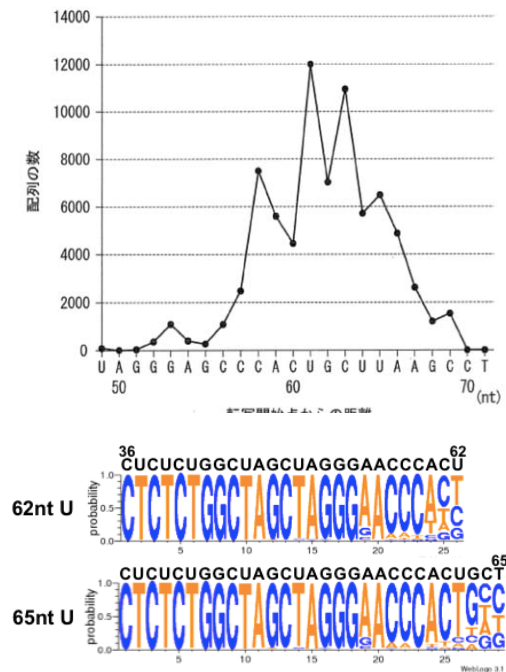


図3 short transcriptの配列解析

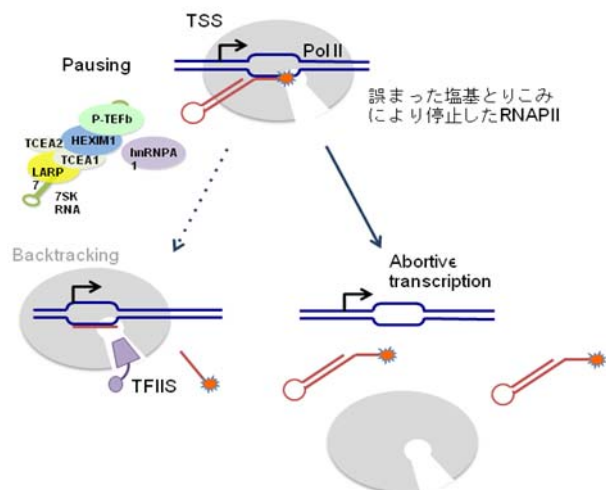


図4 HEXIM1-7SKによるHIV転写伸張阻害モデル

塩基の末端に 5-10 塩基ほどに誤った塩基の取り込みが起きており、RNA の取り込み異常を呈して停止していることを明らかにした(図 3)。この結果から HIV の short transcript の生合成機構のひとつの分子機構として HEXIM1-7SK 複合体が LTR から読まれている最中の short transcript に動員され、RNA polymerase II 複合体の直近において TFIIS を不活化することにより、転写の不完全な停止を引き起こしているモデルが考えられる(図 4)。

③HIV-1 short transcriptの効率的定量法の作製

HIV-1 感染症において、血液中のウイルス量は病態の程度や経過を把握する指標となり、治療開始の判断や抗ウイルス薬の効果判定、治療変更の判断などに利用される。とりわけHIV感染症の検査のうち、高感度法として現在、血中に存在するウイルスゲノムのRNA量を定量する核酸増幅検査法(以下、qRT-PCR)が一般的であり、抗原、抗体検査と併用して行われている。我が国では血清検体による測定が一般的であり、この検査キットは主に血清中に存在する HIV-1 のRNA を蛍光プローブにて検出する。この方法による急性感染期の患者の検査における問題点として主に以下の二点が挙げられる。

①血清中のウイルス量が検出閾値以上に達するまでに、平均で12日ほどをウイルス暴露から日数として必要とする(window period)。

②症例によっては感染していながらも極めて低値な血中ウイルスRNA量の場合、検出が困難となる場合や、逆にある頻度で偽陽性が生じることがある。

以上の問題点を解決する為にも現行のHIV検査法のさらなる確定感度、安定性を改善することは、window periodの短縮や、今後、世界的な方向性になりつつあるエイズ予防治験機構により昨年発表された臨床治験の結果が推奨するHIV早期発見、早期治療にも直結し、HIV感染者が右肩上がりで増加し続ける日本、ひいては発展途上国においても緊急性が高く、社会的要請が非常に強いことが示唆される。

本研究期間において、感染後、HIVが宿主ゲノムにインテグレートされた後に発現するおよそ 60 nt ほどの短鎖RNA(short transcript)が存在することを見だし、そのshort transcriptを簡便かつ効率的にTaqMan probeを用いた定量法を確立した(図5、6)。このshort transcriptはウイルスの発現初期段階で読まれていることに着目し、感染暴露直後の急性感染期の血中HIV検出

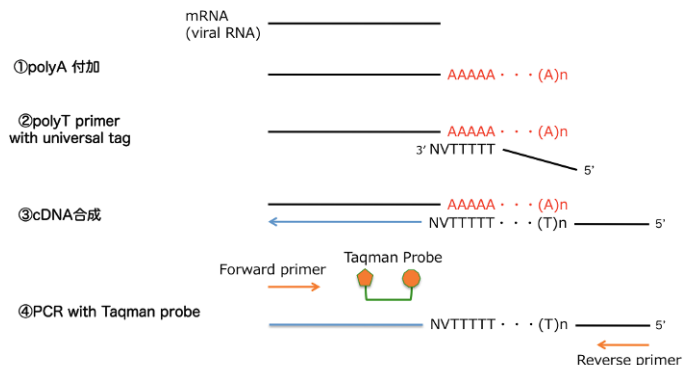


図5 HIV-1 short transcript 定量のためのPCR法の原理

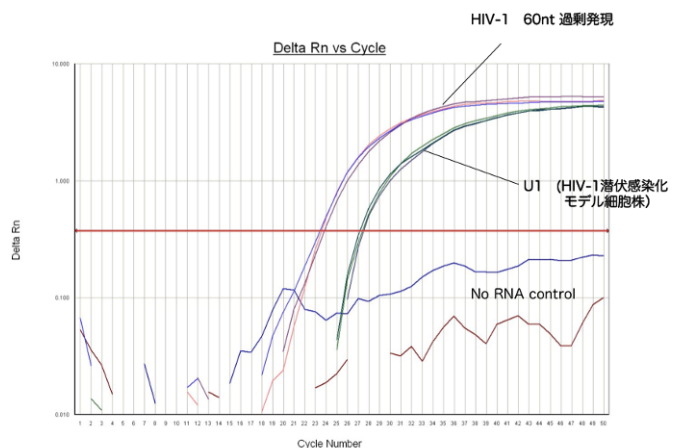


図6 Real Time PCRによるHIV-1 short transcript 検出法の結果

法としてwindow periodのさらなる短縮ができる可能性がある。一方、興味深い特筆すべき点として、この短鎖RNAはウイルスを産生していないと考えられる潜伏感染化細胞でも検出されることにある。すなわち考案したshort transcriptを検出する方法論を用いることでこれまでにその挙動が未解明である感染者体内の潜伏感染細胞や潜伏ウイルスの挙動を数値化できる技術に発展する可能性があり、血液検査応用によるwindow periodの短縮化のみならず、現行では検出限界以下のウイルスの増殖をモニターすることで、カクテルに用いる抗ウイルス薬の是非についてもより効果的に選択出来るようになる可能性がある。また将来的には本方法と免疫染色等を組み合わせることで、各臓器、組織における治療中のHIVの潜伏先などが特定できるようになり、新たな治療戦略の礎となることが期待される。

3. 今後の展開

本研究結果より、一部のHIV-1の潜伏感染化の原因は転写開始ではなく転写伸張段階にあることを明らかにするとともに、転写伸張を抑制的に制御する宿主側因子を同定するとともに、その新規の転写抑制モデルを提案できた。さらにその分子機構は不明であるが、short transcriptの末端の配列は塩基の誤った取り込みが蓄積して転写停止していることを見いだした。しかしHIV-1のshort transcriptの末端配列の塩基の誤った取り込みがいつどのように起きているのかという新たな疑問が生まれ、この分子機構を明らかにすることで、より一層、潜伏状態のHIVの実態にせまれるのではないかと考えている。一方、short transcriptの検出法は実態の見えなかった潜伏感染化HIVを解析するツールとして今後さらに基礎研究を必要とするものの、臨床応用にも貢献ができると考えている。

4. 自己評価

申請者の目標は機能性RNAとしてshort transcriptを位置づけ、HIV潜伏感染化におけるその機能を明らかにするというものであったが、当初の見込みの甘さからか、仮説を裏付けるデータを研究期間内で得られなかったことが反省点である。しかしサブテーマとして提案した、short transcriptの生合成機構については研究期間内にそれなりの進捗を得ることができた。特にshort transcriptを定量出来るようになったことが、研究進捗の上で大きかったと考えている。

この方法論はHIV感染症、ひいては他のウイルスを含め臨床検査技術に応用できる可能性があるという点で、さらなる基礎研究推進を進め、社会還元に貢献していきたい。

5. 研究総括の見解

HIV-1潜伏感染T細胞において、HIV-1の転写伸長が途中で停止して生じたと考えられる短鎖のRNAが検出される。本研究では、この短鎖RNAのHIV-1潜伏感染における存在意義を明らかにし、その生合成機構をも解明することを目的とした。しかしながら、この短鎖RNAを機能性RNAの一種と捉える努力が実らなかったことは残念である。一方、生合成機構の研究に関しては、ある程度の結果を得ている。特に、短鎖RNAの定量を可能にしたことは、これまで実態が不明であった潜伏感染化HIVを解析するツールとして期待される技術である。また臨床応用にも貢献できる可能性を示すところまで研究を進めたことを評価している。

6, 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. ***Mizutani T**, Ishizaka A, Tomizawa M, Okazaki T, Yamamichi N, Kawana-Tachikawa A, Iwamoto A, Iba H. Loss of the Brm-type SWI/SNF chromatin remodeling complex is a strong barrier to the Tat-independent transcriptional elongation of human immunodeficiency virus type 1 transcripts. J Virol. 83:11569-80. 2009

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者: 水谷 壮利

発明の名称: HIV 検出用オリゴヌクレオチド、HIV 検出キット、及び HIV 検出方法

出 願 人: 独立行政法人科学技術振興機構

出 願 日: 2012/1/25

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. HIV-1 promoter is negatively regulated by hnRNP A1
水谷 壮利、石坂 彩、伊庭 英夫
第 59 回 日本ウイルス学会学術総会、国際微生物学連合 2011 会議、合同学会(2011.9.11-16)
2. RNA affinity tandem purification を利用した HIV-1 RNA 結合因子の探索
水谷 壮利、石坂 彩、伊庭 英夫
第 58 回 日本ウイルス学会学術総会(2010.11.7-9 徳島)
3. Analysis for the regulation of transcriptional elongation of HIV-1 transcript by proviral non-coding RNA
Taketoshi Mizutani, Aya Ishizaka, and Hideo Iba
第 10 回 あわじしま感染・免疫フォーラム (2010.9.7-10)