

令和 1 年 12 月 26 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 589

氏 名

町田 晋一

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: モンペリエ (フランス 国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

ヒストンバリエーションによるクロマチン構造制御が HIV の病原性発現に及ぼす影響の解析

3. 派遣期間: 平成 29 年 12 月 1 日 ~ 令和 1 年 11 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

Institute of Human Genetics, Molecular Virology Lab

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

本研究の目的は、クロマチン構造による HIV 発現の制御機構の解明である。

これまでに、HIV 感染及び複製サイクルをターゲットとした様々な抗 HIV 薬が開発されてきた。それらを組み合わせて投薬する多剤併用療法(HAART 療法)は HIV 感染者の後天的免疫不全症候群(AIDS)発症を阻止することを可能とした。しかし、薬剤耐性ウイルスの出現や薬剤の副作用などの問題が残されている。さらには、HAART 療法を行った場合でも、微量の HIV 複製により恒常的な免疫系の活性化が起こり、老化の促進が引き起こることが報告されている。したがって、HIV の感染及び複製サイクルの詳細なメカニズムの解明は、それらの問題を解決し、画期的な HIV 治療法の確立と発展に不可欠であると言える。

HIV 感染初期において、ウイルス RNA は逆転写により、ウイルス DNA(vDNA)として細胞核内に侵入し、ヒトのゲノムに組み込まれる(インテグレーション)。しかし、逆転写からインテグレーションに至るまでの vDNA の動態に関して、不明な点が多い。特に、unintegrated vDNA からの HIV 遺伝子発現が抑制され、インテグレーション後に HIV 遺伝子発現が亢進するメカニズムは不明である。興味深いことに、新生された vDNA はヒストンが結合していない裸の DNA として細胞核内に侵入する。ヒトの細胞核内において、DNA 複製や DNA 修復後に新生されたゲノム DNA 上には、即座にヒストンが集積し、クロマチン構造が形成される。さらには、ヒトのゲノムでは、親鎖のエピゲノムが娘鎖に継承されていくことが知られている。しかし、逆転写により新生された vDNA にクロマチンが形成され、新規のエピゲノムが構築されるメカニズムはわかっていない。よって、「いつ vDNA 上にクロマチン構造及びエピゲノムが形成されるのか」、さらには「vDNA 上に形成されたクロマチン構造が、どのように HIV 遺伝子発現に影響を及ぼすのか」を明らかにすることで、HIV 感染初期における HIV 発現制御機構の詳細が解明される。

そこで本研究では、組込み前後の vDNA に形成されるクロマチン構造及びエピゲノムを解析し、HIV 感染初期におけるクロマチンによる HIV 発現制御機構を明らかにすることを試みた。

(1) HIV 感染動態の解析

HIV 感染初期の HIV 発現を解析した。具体的には、T 細胞由来の培養細胞株である Jurkat 細胞に HIV-Luc (LTR をプロモーターとして Luciferase を発現する HIV)を感染させ、感染 9、24 及び 48 時

間後の HIV 発現レベルを Luciferase assay により解析した(図 1A)。その結果、感染 24 時間後から顕著な HIV の発現が観察された。次に、vDNA の動態を解析するために、感染 3、6、9、12、24 及び 48 時間後の HIV の総 vDNA 量及びインテグレーションされた vDNA(integrated vDNA)量を測定した(図 1B 及び 1C)。具体的には、T 細胞由来の培養細胞株である Jurkat 細胞に HORCG を感染(MOI(多重感染度)=0.15)させたのちに、全 DNA を抽出し、特異的なプライマーを用いて vDNA 量及び integrated vDNA 量を定量 PCR により測定した。その結果、総 vDNA 量は感染 12 時間で最大となること、integrated vDNA は感染 24 時間で最大となることがわかった(図 1B 及び 1C)。また、感染 9 時間後の vDNA は主に unintegrated vDNA であることがわかった。さらに、感染 9 時間後において、HIV 発現が抑制されていることから、先行研究と同様に、unintegrated vDNA からの HIV 発現が抑制されていることがわかった。

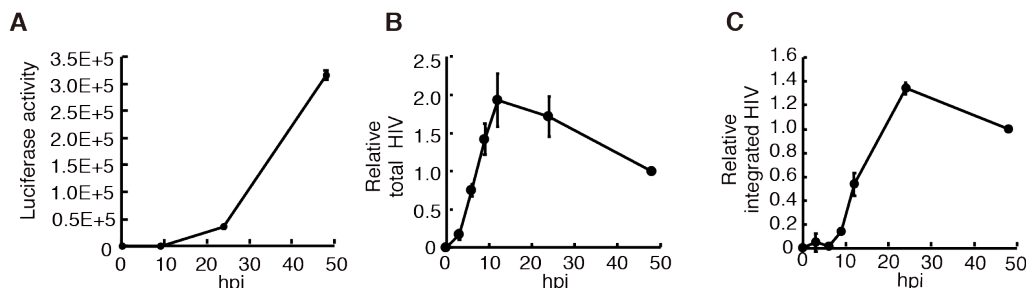


図 1 HIV 感染動態の解析

(A) HIV 感染 0, 9, 24, 48 時間後の HIV 発現を Luciferase assay により解析した。

(B and C) HIV 感染 0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 時間後の総 HIV vDNA (B) 及び integrated vDNA (C) を測定した。

(2) ヒストン H3 及び H2B はインテグレーション非依存的に vDNA 上に集積する

unintegrated vDNA 上にクロマチン構造が形成されるかを解析するために、ヒストン H3 及び H2B に対する特異的抗体を用いて、クロマチン免疫沈降解析(ChIP)を行った(図 2)。unintegrated vDNA へのヒストンの集積を解析するために、図 1 より、HIV 感染 9 時間後に ChIP を行った(MOI=0.15)。一方で、integrated vDNA へのヒストンの集積を解析するために、図 1 より、HIV 感染 48 時間後にも同様に ChIP を行った。ChIP 後のサンプルから抽出した DNA を用いて、定量 PCR により、vDNA(DNase Hypersensitive Site (DHS)、Nuc1、Nuc2 及び Vif)及びコントロール領域(GAPDH プロモーター 領域(GAPDH pro.)、GAPDH コーディング領域(GAPDH cod.)及び B13 (19 番染色体上の遺伝子を含まない領域))におけるヒストンの集積レベルを解析した。その結果、HIV 感染 9 時間後からヒストン H3 及び H2B が vDNA 上に集積することが明らかになった(図 2A and 2B)。また、HIV 感染 48 時間後の vDNA 上にも、ヒストン H3 及び H2B の集積が観察された(図 2A and 2B)。これらの結果は、unintegrated 及び integrated vDNA にヒストン H3 及びヒストン H2B が集積し、ヌクレオソーム様の構造体が形成されることを示唆する。さらに、インテグレーションを特異的に阻害する薬剤である raltegravir 存在下において、同様の実験を行った。その結果、raltegravir 存在下においても同様に、HIV 感染 9 及び 48 時間後の vDNA におけるヒストン H3 及び H2B の集積が観察された(図 2C and 2D)。これらの結果より、ヒストン H3 及び H2B が integrated vDNA だけでなく unintegrated vDNA 上にも集積することが明らかになった。次に、どの段階で vDNA にクロマチン構造が形成されるかを解析した。まず、逆転写阻害剤である nevirapine 存在下において、vDNA への H3 の集積を ChIP 法により解析した。その結果、nevirapine 添加により、H3 の vDNA への集積がほとんど観察されなかった(図 2E)。この結果は、逆転写反応後に、vDNA にクロマチン構造が形成されることを示す。また、調製したビリオン中に混入したプラスミド DNA が ChIP の結果にほとんど影響を及ぼしていないことを示している。さらに、vDNA の核内移行を阻害する薬剤(PF74)存在下において、vDNA への H3 の集積を ChIP 法により解析した(図 2F)。また、細胞分裂時の核膜崩壊による vDNA の核内移行の影響を排除するために、PMA 処理によりマクロファージ様の細胞に分化させた THP-1 を用いて解析を行った。その結果、PF74 添加により、vDNA への H3 の集積が顕著に減少した。これらの結果から、vDNA へのヒストンの集積は vDNA が核内に移行したのちに起こることが明らかになった。

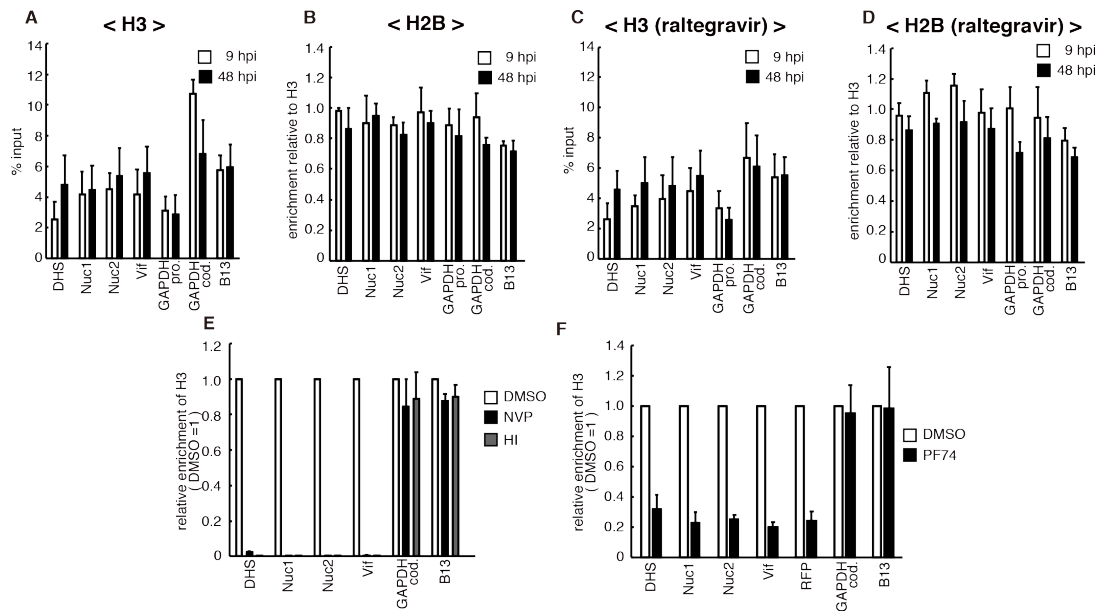


図2 vDNA へのヒストンの集積

(A-D) HIV 感染 9 及び 48 時間後の vDNA におけるヒストン H3 及び H2B の集積を ChIP assay により解析した (MOI=0.15)。ChIP は抗 H3 抗体 (A and B) 及び抗 H2B 抗体 (C and D) を用いて、raltegravir 非存在下 (A and C) 及び存在下 (B and D) にて行った。

(E) 逆転写阻害剤である nevirapine 存在下にて、vDNA への H3 の集積を ChIP 法により解析した。(HI: heat-inactivated HIV, NVP: nevirapine)

(F) vDNA の核内移行を阻害する薬剤 (PF74) 存在下において、vDNA への H3 の集積を ChIP 法により解析した。

(3) unintegrated vDNA 上では DHS 領域にフレキシブルなヌクレオソームが形成される
ChIP 解析より、核移行後の vDNA 上にヒストンが集積することが明らかになった。そこで、遺伝子発現制御に重要なヌクレオソームポジショニングを解析した。具体的には、Jurkat 細胞に HIV を感染させ (MOI=0.2)、感染 9 及び 48 時間後の vDNA 上のヌクレオソームポジショニングを MNase-seq により解析した。また、低い MOI のコンディションにて MNase-seq を行うために、vDNA をターゲットとしたタンデムオリゴ RNA を用いてハイブリダイゼーションすることにより、vDNA 由来の DNA 断片を選択的に濃縮し、ライブラリーを作製した。感染 9 及び 48 時間後のヌクレオソームポジショニングを比較したところ、HIV-LTR 領域に顕著な変化が観察された (図 3)。興味深いことに、unintegrated vDNA では、エンハンサー/プロモーターを含む DNase Hypersensitive Site (DHS) 上にフレキシブルなヌクレオソームが形成されていることが明らかになった。さらに、DHS 上のヌクレオソームはインテグレーション後に消失することが明らかになった。

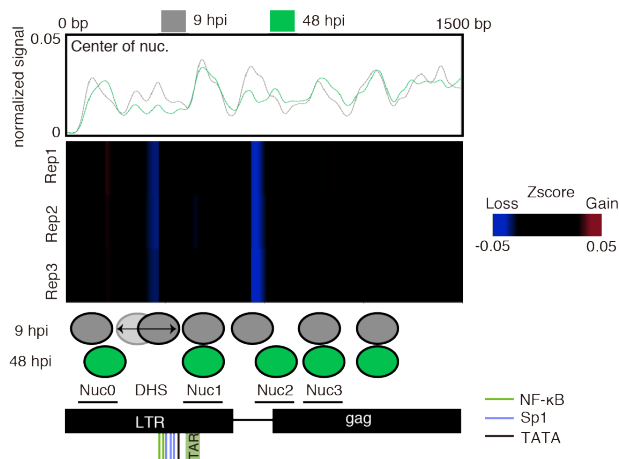


図3 HIV 感染初期における HIV LTR 上のヌクレオソームポジショニング

HIV 感染 9 及び 48 時間後の vDNA におけるヌクレオソームポジショニングを MNase-seq により解析した。上段の図では、ヌクレオソームの中心位置をプロットした。中段のヒートマップでは、感染 9 と 48 時間後のデータの差異を示した (FDR < 1e-3 のみをヒートマップで示した)。下段の図では、MNase-seq より得られたヌクレオソームの配置を模式的に示した。さらに、先行研究より明らかになっているヌクレオソーム (Nuc0, Nuc1, Nuc2 及び Nuc3) 及び DHS の位置を示した。

(4) RNA ポリメラーゼ II はインテグレーションされた vDNA 上に集積する

DHS は HIV のエンハンサー/プロモーターを含む領域であることから、unintegrated vDNA における DHS 上のヌクレオソームは RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) を含む転写複合体の集積を阻害することが予想された。そこで、HIV 感染 9 及び 48 時間後の細胞から抽出したクロマチンを用いて、RNAPII の vDNA への集積を ChIP により解析した(図 4A)。その結果、RNAPII は感染 9 時間後の LTR にはほとんど集積していないことが明らかになった。一方で、RNAPII の集積は感染 48 時間後に増加した。また、raltegravir 添加により、その集積が著しく低下した。これらのことから、RNAPII の unintegrated vDNA への集積が抑制されていること、さらに、integration 後に RNAPII が vDNA 上に集積することが明らかになった。さらに、転写活性化領域のマーカーである H3Ac 及び H3K4me3 を ChIP により解析したところ、RNAPII と同様に、H3Ac 及び H3K4me3 は integrated vDNA に優先的に集積することが明らかになった(図 4B and 4C)。

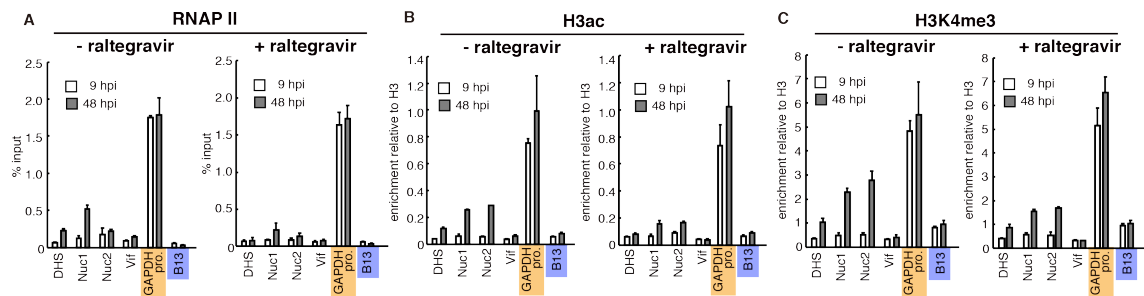


図 4 RNAPII 及びアクティブヒストンマークは integrated vDNA に優先的に集積する

HIV 感染 9 及び 48 時間後の vDNA における RNAPII、H3ac 及び H3K4me3 の集積を ChIP 法により解析した(MOI=0.15)。ChIP は抗 RNAPII 抗体(A)、抗 H3ac 抗体(B)、及び抗 H3K4me3 抗体(c)を用いて、raltegravir 非存在下及び存在下にて行った。ポジティブコントロールとして GAPDH pro.、ネガティブコントロールとして B13 を用いた。

本研究により、HIV 感染初期におけるクロマチン構造を介した HIV 発現制御機構が明らかになった。コアヒストンは核内に移行した直後の vDNA 上に集積し、インテグレーション非依存的にヌクレオソーム構造が形成されることが明らかになった。興味深いことに、unintegrated vDNA の DHS には、フレキシブルなヌクレオソームが形成されていることがわかった。さらに、DHS に形成されたヌクレオソームは、RNAPII の集積を阻害し、unintegrated vDNA からの転写を抑制することが示唆された。一方で、インテグレーション依存的に、H3Ac 及び H3K4me3 が LTR 領域に導入され、さらに、DHS に形成されたヌクレオソームが除去されることが明らかになった。以上のように、HIV 感染初期の vDNA 上に形成されるクロマチン構造は、ダイナミックに変化し、HIV の遺伝子発現を制御することが示された。