

第6回 ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞受賞研究

AP-4 による HIV プロウイルスの負の転写制御機構

Transcriptional Repression of Human Immunodeficiency Virus Type 1 by AP-4

今井 健一

Kenichi IMAI

名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学

Department of Molecular and Cellular Biology,
Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences

日本エイズ学会誌 8 : 86-91, 2006

はじめに

エイズウイルスにおけるウイルス遺伝情報量の増大過程は、プロウイルスからの転写の過程であるためウイルスの複製が宿主転写制御機構に大きく依存する。逆転写の過程ではプロウイルス DNA 合成の際にゲノム RNA が RNase H によって分解されるため遺伝情報量の増大は起こらない。これまでの HIV 転写研究から、特に潜伏感染細胞からのウイルス複製の活性化は、宿主細胞の転写活性化因子 NF- κ B とウイルスの持つトランス活性化因子 Tat によって段階的に制御されていることが明らかとなった¹⁾。NF- κ B をはじめとする DNA 結合性転写活性化因子の LTR への結合は、コアクチベーターの作用によるヒストンアセチル化に伴うクロマチン構造の弛緩と TBP (TFIID) 等の基本転写因子や RNA polymerase II のリクルートメントを促す。他方、Tat は転写の始まったばかりの mRNA の TAR 領域に特異的に結合し、転写伸長促進因子である P-TEFb をリクルートすることにより HIV プロウイルスの転写を著しく上昇させる。

HIV の転写活性化機構が、転写因子レベル、あるいはクロマチンレベルで明らかとなった一方で、HIV 転写の負のメカニズムに関しては不明な点が多い。HIV 発現の抑制機構が転写レベルで明らかになれば、潜伏感染維持機構の解明へとつながることが期待できる。これまでに、転写因子 YY-1 が HDAC を LTR にリクルートすることにより、ヒストンの脱アセチル化をひきおこしクロマチンレベルで HIV の転写を抑制していることが報告されている²⁾。また、

LTR 上の negative regulatory element (NRE) に結合する転写因子が HIV の転写を抑制するという報告があるが、詳しい分子機構はわかっていない³⁾。

筆者らは、HIV LTR の TATA box 近傍に転写因子 AP-4 の結合サイトが存在し、AP-4 が HIV 発現の抑制因子として機能していることを見いだした⁴⁾。

転写因子 AP-4 と HIV LTR

以前筆者らは、Tat 被制御遺伝子を包括的に検索した結果、DNA 修復酵素である OGG1 を同定した。Tat による詳細な OGG1 遺伝子発現の誘導機構を解析したところ、AP-4 が OGG1 の発現を負に制御しており、Tat は AP-4 と結合してその作用を抑制することで OGG1 の転写を誘導していることを見いだした⁵⁾。その後の解析で、HIV LTR の TATA box 近傍 (-22~-17) に AP-4 の結合サイトが存在すること、さらに種々の HIV サブタイプ LTR の AP-4 結合サイトを調べた結果、サブタイプ B, A, C 等多くのサブタイプで AP-4 の結合配列 (CAGCTG) が良く保存されていることに着目した。AP-4 は 15 年程前に Tjian らによって SV40 late gene を活性化する因子として見つかった HLH-Zip 型の転写因子である⁶⁾。その後の研究で、TGF- β や Caspase 9, Angiotensinogen などの遺伝子プロモーターに AP-4 の結合サイトが存在することが報告されたが、相互作用因子をはじめ AP-4 による詳細な遺伝子発現制御機構については一切報告がない。AP-4 結合サイトが LTR TATA box 近傍に存在し、またその配列が良く保存されていることから、AP-4 が HIV の転写において何らかの作用を及ぼしている可能性が推察された。

AP-4 は HIV の転写を負に制御する

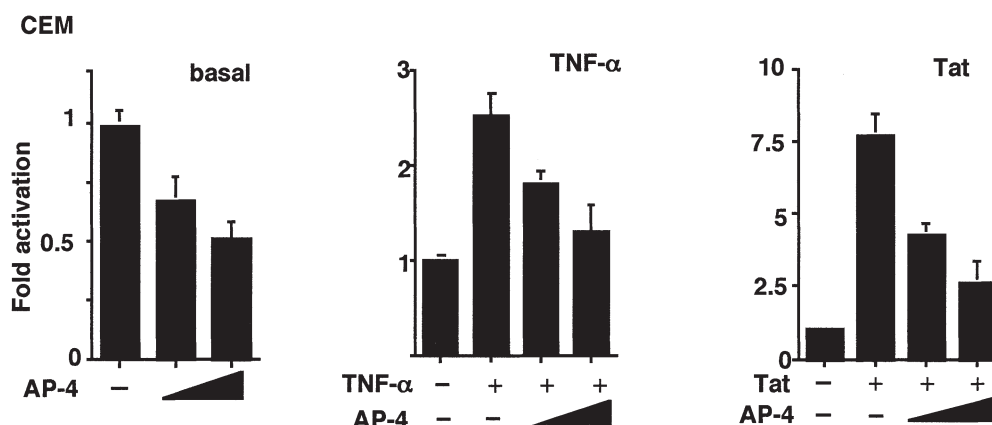
はじめに、AP-4 が HIV の転写に及ぼす影響を T 細胞および単球系細胞を用いて Luciferase assay にて調べた。そ

著者連絡先：今井健一 (〒467-0031 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄 1 名古屋市立大学大学院医学研究科細胞分子生物学)

Fax : 052-859-1235

2006 年 5 月 19 日受付

A



B

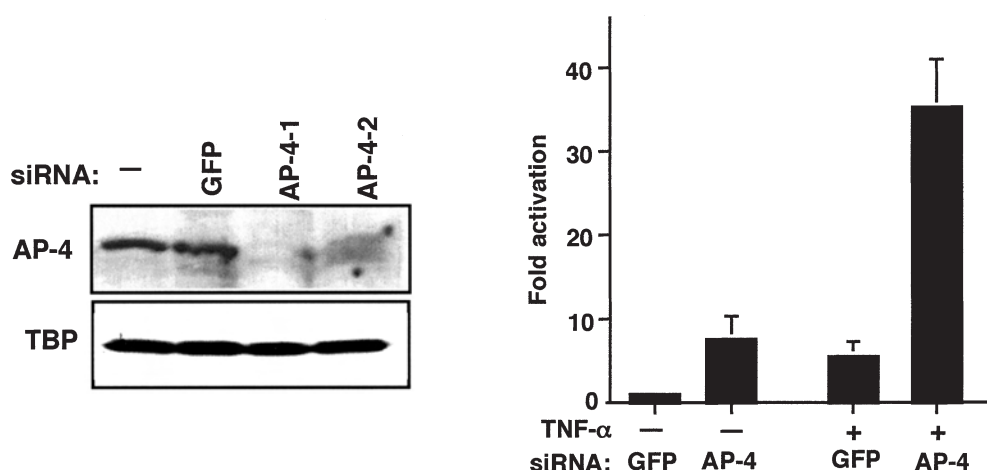


図 1 AP-4 は HIV の転写を負に制御する

A. CEM 細胞に LTR を導入し Luciferase assay を行った結果, AP-4 は HIV の転写を抑制した。B. 293 細胞に siRNA を導入し内在性の AP-4 の発現をノックダウンさせると (左図), HIV の転写活性が上昇した (右図)。

の結果, AP-4 は basal レベルでの転写と Tat や TNF- α による HIV の転写活性を強く抑制した (図 1A)。LTR の AP-4 サイトを変異させた変異型 LTR においては抑制作用は認められなかった。実際に内在性の AP-4 が抑制因子として機能しているか否かを調べるために, AP-4 に対する siRNA を細胞に導入した結果, HIV の転写活性は逆に上昇した (図 1B)。以上の結果から, AP-4 は HIV 転写の抑制因子として機能していることが明らかとなった。

AP-4 は HLH-Zip 型の転写因子であり, N 末端に DNA 結合に関わる HLH ドメインと dimerization に関わる leucine repeat (LR), C 末端には Q,P-rich と acidic ドメインが存在する⁷⁾。HIV 転写抑制における AP-4 の機能ドメイン

を調べるために, 種々の変異型 AP-4 を作製しその効果を検討した。その結果, HLH ドメインを除いた変異型 AP-4 では抑制効果が認められなかったことから, HIV 転写の抑制には DNA との結合が必須であることがわかった。

AP-4 による HIV 転写の抑制機構

AP-4 がどのようなメカニズムで HIV の転写を抑制しているのか解析を進めた。AP-4 の結合サイトが TATA box の近傍に存在することから, AP-4 が TBP の TATA box への結合を阻害している可能性が推察された。この点を AP-4 の組み換え蛋白を作製し EMSA にて検討した結果, AP-4 は TBP の TATA box への結合を濃度依存的に抑制した

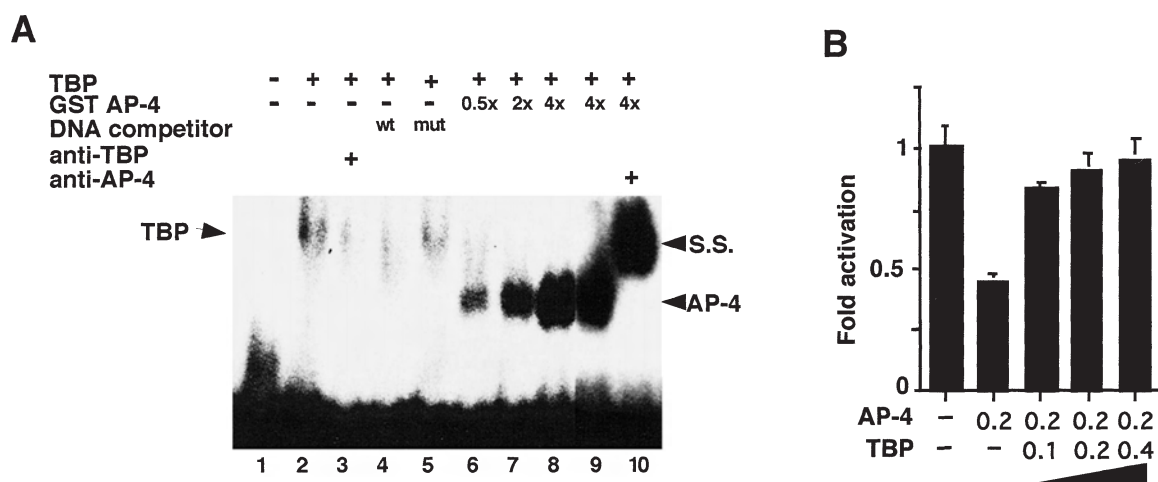


図 2 AP-4 は TBP の TATA box への結合を阻害する
 A. HIV LTR を用いた EMSA assay. AP-4 は濃度依存的に TBP の TATA box への結合を阻害した。
 B. Luciferase assay. TBP の発現により AP-4 による HIV 転写の阻害効果が解除された。

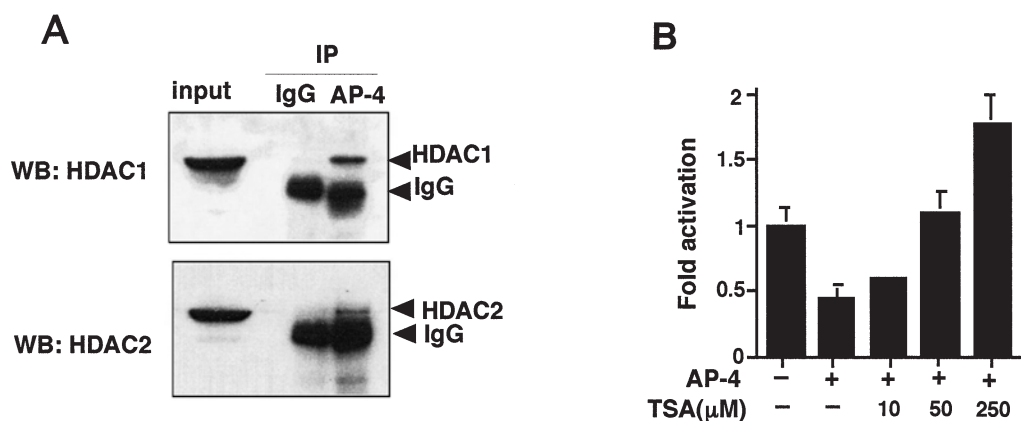


図 3 AP-4 は HDAC と結合する
 A. AP-4 抗体で免疫沈降を行った結果, AP-4 は内在性の HDAC1, 2 と結合した。B. HDAC の阻害剤である TSA 処理により AP-4 による HIV 転写の阻害効果が解除された。

(図 2A)。AP-4 と TBP の拮抗作用は *in vivo* においても確認でき, AP-4 による HIV の転写阻害作用は TBP の強制発現によって解除された (図 2B)。

AP-4 による HIV 転写の抑制が TATA box のマスキングのみに依存しているか否かを調べるために, LTR 上の AP-4 の結合サイトを TATA box から離して AP-4 の効果を検討した。そのために, 本来の AP-4 結合サイトを変異させた LTR に, TATA box から様々の距離の所に新たに AP-4 サイトを挿入した変異型 LTR を作製し Luciferase assay を行った。その結果, 野生型 LTR にはおとるものの, AP-4 サイトを TATA box から離れた位置に挿入した LTR におい

ても AP-4 による阻害効果が認められた。以上の結果から, AP-4 は TBP のマスキング以外にも, 何らかのメカニズムで HIV の転写を抑制していることが推察された。

近年, 転写の抑制機構において HDAC によるクロマチンレベルでの抑制が注目されている。そこで, AP-4 の HIV 転写抑制作用における HDAC の関与を検討した。AP-4 と HDAC が結合する可能性を推察し免疫沈降法にて調べた結果, AP-4 は内在性の HDAC1, および 2 と結合することが認められた (図 3A)。実際に, AP-4 による抑制作用に HDAC が関与しているか否かを確認するために, HDAC の阻害剤である TSA を用いて検討した結果, TSA

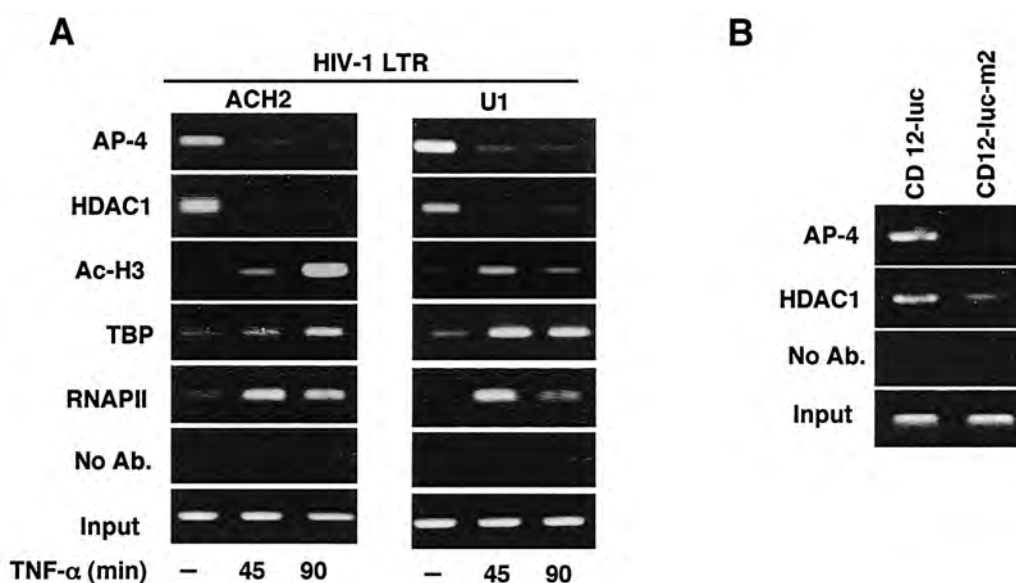


図4 HIV 慢性潜伏感染細胞における ChIP assay

A. ACH2, U1 細胞を用いて ChIP assay を行った結果, 未刺激状態の細胞においては LTR への恒常的な AP-4 と HDAC1 の結合が認められた。TNF- α 刺激後には AP-4 と HDAC1 が遊離し, 逆に TBP と pol II が LTR にリクルートされてくること, さらにヒストンのアセチル化がおこなわれていることが認められた。B. AP-4 の結合サイトを変異させた LTR を用いた ChIP assay では, リクルートされる HDAC1 が減少した。

処理により AP-4 による HIV の転写阻害作用は解除された (図 3B)。

HIV 潜伏感染細胞 LTR 上での AP-4 結合のダイナミズム

実際の HIV 感染細胞内での AP-4 と TBP, HDAC の動態を調べるために, HIV 慢性潜伏感染細胞である ACH2 と U1 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を行い検討した。その結果, 未刺激状態の細胞においては LTR への恒常的な AP-4 と HDAC1 の結合が認められ, TNF- α で細胞を刺激すると, LTR から AP-4 と HDAC1 が遊離し, 逆に TBP と pol II が LTR にリクルートされてくること, さらにヒストンのアセチル化がおこなわれていることが認められた (図 4A)。AP-4 の結合サイトを変異させた LTR を細胞に導入しクロマチン免疫沈降を行った結果, リクルートされる HDAC1 が減少したことから, AP-4 が HDAC1 を LTR にリクルートしていることが推察された (図 4B)。

HIV 複製に対する AP-4 の抑制効果

HIV 複製に対する AP-4 の効果を検討するために, Jurkat T 細胞に pNL4-3 を導入し p24 ELISA assay を行った。その結果, AP-4 は basal レベルでのウイルス複製と TNF- α による HIV の複製を抑制した (図 5A)。他方, AP-

4 siRNA を pNL4-3 とともに細胞に導入すると HIV の複製は逆に上昇した (図 5B)。

以上の結果から, AP-4 が TATA box のマスキングと HDAC のリクルートによって HIV の転写を負に制御していることが明らかとなった。HIV 慢性潜伏感染細胞において, 未刺激の状態では AP-4 が TATA box をマスキングすると同時に HDAC を LTR にリクルートしていること, TNF- α の刺激が入ると AP-4 と HDAC が LTR から遊離し代わりに TBP と pol II が LTR にリクルートされた結果を考え合わせると, 感染細胞内での AP-4 の動態が HIV の潜伏感染維持に重要な役割を担っている可能性が推察される。

おわりに

多施設の臨床研究より感染者体内での HIV 量が AIDS の発症および薬剤耐性ウイルスの出現頻度と高く相関することが明らかになった⁸⁾。このことから, HIV 複製を抑制することで AIDS 発症が遅延し, HAART 療法の有効性が向上することが予測された。しかし, 血中ウイルス量が検出限界以下になってもなお潜伏感染細胞が存在することが問題となっている。従って, AIDS 発症を食い止めるには潜伏感染細胞のプロウイルスからの転写活性化を阻止することが必須であると考えられる。一方で, 潜伏感染細胞からのウイルス複製をよびおこし, HAART と組み合わせる

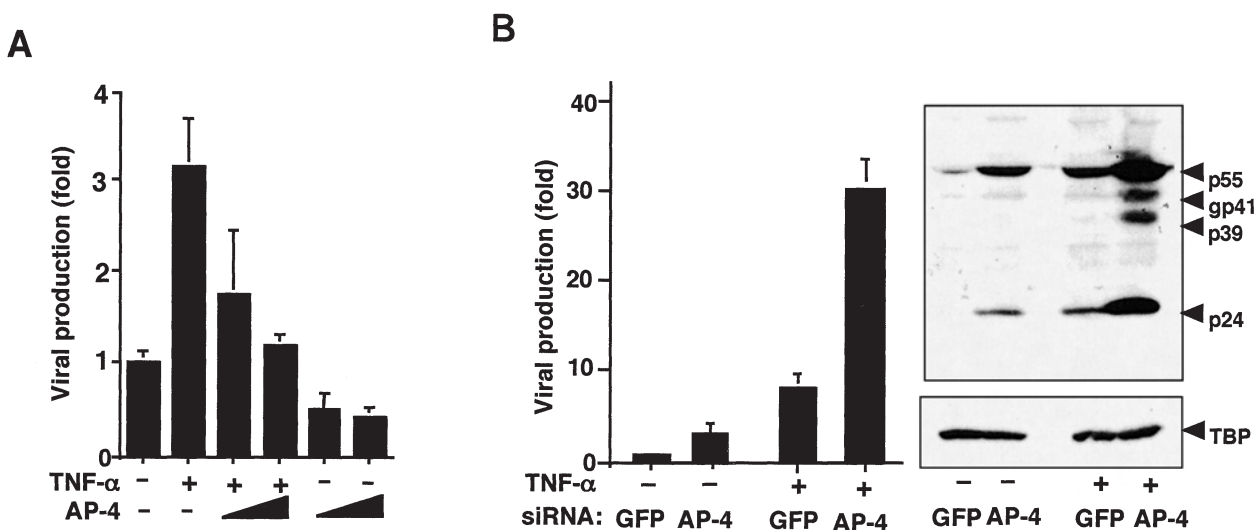


図 5 HIV 複製に対する AP-4 の抑制効果
 A. Jurkat T 細胞に pNL4-3 を導入し ELISA にて p24 量を測定した。B. 293 細胞に AP-4 siRNA を導入した結果, HIV の複製が上昇した。

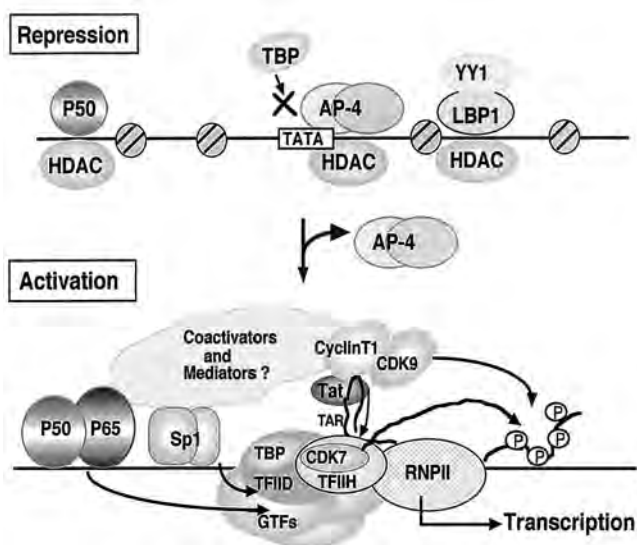


図 6 AP-4 による HIV 発現の抑制メカニズム
 未刺激状態の細胞では, NF-κB p50, YY-1 が HDAC を LTR にリクルートすることが報告されている。AP-4 は TBP の排除と HDAC のリクルートにより強力に HIV の発現を負に制御していると考えられる。TNF-α などの刺激が入ると NF-κB 等の活性化に伴いリクルートされてくるコアクチベーターなどの作用により, クロマチンの修飾がおこり LTR から AP-4 と HDAC が遊離する。その後, TBP などの基本転写因子群が呼び込まれ HIV の転写が始まると考えられる。

ことによって潜伏感染細胞を排除しようとする臨床治験が実施されている。休止期にある HIV 感染 T 細胞に対し HDAC1 阻害剤 valproic acid⁹⁾ や IL-7¹⁰⁾ を用いた結果, いずれの場合も潜伏感染細胞が有意に減少したことを報告している。しかしながら, HAART で用いる抗ウイルス剤の多くは脳などの組織への移行が充分でない (サンクチュアリ) ことから, このような治療法ではたとえ末梢血中のウイルス量を減らすことができて, かえって脳内の HIV を増やす可能性があるため, 長期間の治療効果を厳密に評価する必要がある。

AIDS 治療は HAART 療法により新たな段階を迎えるに至ったが, HIV は感染者の体内に潜伏感染し続ける性質を持つため, 現在の治療法が AIDS 発症防止に対しても長期間有効であるという保証はなく, また副作用や薬剤耐性ウイルスの出現など多くの課題が残されており, 次世代の AIDS 治療薬・発症予防薬の開発が急務となっている。さらなる HIV の転写調節機構の解明は, 新たな AIDS 治療法の開発につながる事が期待できる。

謝辞: この度は ECC 山口メモリアルエイズ研究奨励賞を受賞させていただきありがとうございました。本賞の審査員の先生方, 並びにご指導下さった岡本 尚教授をはじめとする諸先生方にお礼申し上げます。

文 献

1) Price DH : P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. Mol Cell Biol 20 :

- 2629–2634, 2000.
- 2) He G, Margolis DM : Counterregulation of chromatin deacetylation and histone deacetylase occupancy at the integrated promoter of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the HIV-1 repressor YY1 and HIV-1 activator Tat. *Mol Cell Biol* 22 : 2965–2973, 2002.
 - 3) Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ : A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* 28 : 663–668, 2000.
 - 4) Imai K, Okamoto T : Transcriptional repression of human immunodeficiency virus type 1 by AP-4. *J Biol Chem* 281 : 12495–12505, 2006
 - 5) Imai, K, Nakata K, Kawai K, Hamano T, Mei N, Kasai H, Okamoto T : Induction of OGG1 gene expression by HIV-1 Tat. *J Biol Chem* 280 : 26701–26713, 2005.
 - 6) Mermod N, Williams TJ, Tjian R : Enhancer binding factors AP-4 and AP-1 act in concert to activate SV40 late transcription in vitro. *Nature* 332 : 557–561, 1988.
 - 7) Hu YF, Luscher B, Admon A, Mermod N, Tjian R : Transcription factor AP-4 contains multiple dimerization domains that regulate dimer specificity. *Genes Dev* 4 : 1741–1752, 1990.
 - 8) Stevenson M : HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 9 : 853–860, 2003.
 - 9) Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, Jennings C, Spina CA, Wiegand A, Landay AL, Coombs RW, Richman DD, Mellors JW, Coffin JM, Bosch RJ, Margolis DM : Depletion of latent HIV-1 infection in vivo : a proof-of-concept study. *Lancet* 366 : 549–555, 2005.
 - 10) Wang FX, Xu Y, Sullivan J, Souder E, Argyris EG, Acheampong EA, Fisher J, Sierra M, Thomson MM, Najera R, Frank I, Kulkosky J, Pomerantz RJ, Nunnari G : IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *J Clin Invest* 115 : 128–137, 2005.