

## 総 説

## HIV 複製を制御する宿主因子の探索

## Screenings for Host Factors That Regulate HIV Replication

村 上 努

Tsutomu MURAKAMI

国立感染症研究所・エイズ研究センター

AIDS Research Center, National Institute of Infectious Diseases

キーワード: HIV, 宿主因子, ゲノムワイド siRNA (shRNA) スクリーニング

## はじめに

1996年より導入された HAART 療法はエイズによる死亡者数の顕著な減少に貢献してきた。しかしながら、薬剤耐性ウイルスの出現、重篤な副作用などの問題から、新規の作用点を持った薬剤の登場が望まれている。そのための有力なアプローチの一つが HIV-1 とそれが利用する宿主因子の相互作用を阻害する薬剤の探索と開発である。このような理由に加えて、純粋にウイルス学的興味からも HIV-1 の複製に関与する宿主因子に関する研究が種々の方法論によって行われてきた。中でも注目されたのは 2008 年から今年にかけては発表された siRNA (または shRNA) による宿主因子のノックダウンに基づいたヒトの宿主因子に対する機能的ゲノムワイドスクリーニングによる HIV-1 複製に必要な宿主因子の網羅的探索・同定の試みである。本稿では HIV-1 複製を制御する宿主因子の探索について、この機能的ゲノムワイド siRNA (shRNA) スクリーニングを中心に概説する。

## 機能的ゲノムワイド siRNA (shRNA) スクリーニング

昨年 (2008 年) ゲノムワイドにヒトの宿主因子を siRNA トランスフェクションによってノックダウンし、HIV-1 複製に対する影響をモニターすることによって HIV-1 複製に必要な宿主因子を探索・同定する試みに関する報告が 3 つ報告された。最初の報告は 2 月の Science 誌に発表された<sup>1)</sup>。彼らは CD4 を発現させ、Tat に反応する  $\beta$ -galactosidase レポーター遺伝子を組み込んだ HeLa 細胞 (TZM-bl 細胞) に siRNA のプール (1 遺伝子当たり 4 個) をトランスフェクトし、72 時間後に複製可能な感染性 HIV-1 (IIIB) を感染させた。まず、ウイルス感染の 48 時間後に細胞を p24 カプシドに対して免疫染色し、HIV-1 複製過程の主前期過

程に対する影響を評価した。さらに、ウイルス感染 48 時間後の培養上清を集め、あらたに TZM-bl 細胞に感染させ 24 時間後に  $\beta$ -galactosidase 活性を測定することによって siRNA 処理が感染性 HIV-1 粒子産生に与える影響も評価した。その結果、使用した 21,121 遺伝子のうち 273 遺伝子がコントロールと比較して 2-3 倍 HIV-1 の複製を阻害することが明らかになった。興味深いことに、このうち約 1 割の 28 遺伝子がウイルス複製の後期過程に作用すると推定された。また、今回見出された HIV-1 複製に関与する遺伝子の中で 3 つに絞って簡単な機能解析も同時に行われた。まず、小胞輸送に関与する Rab 蛋白質の一つ Rab6 (ゴルジ装置の逆行輸送に関与することが知られている) が HIV-1 と標的細胞への侵入過程に関与していることを示唆するデータを提示した (同時にやはりゴルジ装置の逆行輸送に関与する Vps53 についても同様の結果を得た)。次に、宿主因子の核移行に関与することが知られている Transportin 3-SR2 (TNPO3) が HIV-1 の核移行にも寄与していること、さらに、転写因子の一つである Med28 がそのノックダウンによって HIV-1 の遺伝子発現は抑制するが、マウス白血病ウイルスの遺伝子発現には影響を与えないことを明らかにした。以上の 3 つの遺伝子の HIV-1 複製過程への関与は新規な発見である。

昨年 10 月には König らによって 2 番目の報告が Cell 誌に発表された<sup>2)</sup>。彼らの研究成果は、主に以下の 2 つの点で前記の論文と異なっていた。すなわち、1) 標的細胞が 293T 細胞であること、2) VSV-G でシュードタイプした luciferase をレポーター遺伝子として組み込んだ複製欠損ウイルスを使用していることである。その結果、siRNA による宿主因子のノックダウンによって評価されるのが HIV-1 Env によって行われる侵入過程を除く複製前期過程 (脱殻、逆転写、ゲノムへの組込み) と転写・翻訳過程に限定されているのが特徴である。1 遺伝子当たり 6 個の siRNA を 2 個ずつまとめて (3 ウェル/1 遺伝子) をトランスフェク

著者連絡先: 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

2009 年 9 月 11 日受付

トし、48時間後に VSV-G でシュードタイプした複製欠損ウイルスを感染させた。まず、ウイルス感染の24時間後にレポーター遺伝子である luciferase の活性を測定して HIV-1 複製過程の主に前期過程に対する影響を評価した。ウイルス複製阻害の特異性を評価するために、VSV-G でシュードタイプしたマウス白血病ウイルス (MuLV) やアデノ随伴ウイルスについても同様の実験プロトコルで評価した。また、同時に siRNA によるノックダウンによる細胞毒性も生細胞数測定により評価した。今回調べられた約 20,000 遺伝子のうち、複数の siRNA 処理によって細胞毒性を示すことなしにウイルスの感染価が 45% 以上減少した遺伝子は 295 個であった。興味深いことに、この 295 個の約 80% は MuLV の複製にも影響を与えており、レトロウイルスで共通に利用できる宿主因子が多数あることが示唆された。295 遺伝子のうち、44 遺伝子が逆転写過程への関与が示され、そのうち 12 遺伝子は脱殻もしくは逆転写の開始に、23 遺伝子は DNA 合成のカイネティクスに影響を与えることが明らかになった。さらに、ウイルス DNA の核移行とインテグレーションに関与する遺伝子はそれぞれ 6, 9 個示された。

Zou らによる 3 番目の siRNA スクリーニングは、初めに述べた Brass らの方法によく似た方法を用いて行われた<sup>3)</sup>。すなわち、CD4 と CCR5 を発現させ、 $\beta$ -galactosidase レポーター遺伝子を組み込んだ HeLa 細胞を標的細胞とし、siRNA のプール (1 遺伝子当たり 3 個) をトランスフェクトし、24 時間後に複製可能な HIV-1 HXB2 株を感染させた。感染後 48 時間と 96 時間後の  $\beta$ -galactosidase 活性を測定して、siRNA によるノックダウンの効果を評価した。感染後 48 時間のアッセイではウイルス複製前期過程 (侵入、脱殻、逆転写、ゲノムへの組込み) と転写・翻訳過程についての評価を、感染後 96 時間ではウイルス粒子形成過程と未感染細胞への感染の拡がりをも含む複製過程全体に対する影響を検討した。スクリーニングの陽性コントロールには Cyclin T1 (転写に関与; 感染後 48, 96 時間の両方でウイルス複製を阻害) と TSG101 (出芽・放出に関与; 感染後 96 時間でのみウイルス複製を阻害) に対する siRNA を使用し、実験条件の最適化を行った。スクリーニングを行った 19,709 遺伝子のうち、確認実験や T 細胞やマクロファージでの発現を考慮に入れて 232 遺伝子が候補遺伝子として選択された。その内訳は、ウイルス侵入に必要な CD4 と CXCR4, Tat を介した転写活性化に関与する因子、ミトコンドリアの機能やエネルギー代謝に関係した因子などである。著者らは siRNA 非感受性の cDNA 発現によるレスキュー実験なども行い、BAMP2 キナーゼや DNA 修復の関与する NEIL3 が HIV-1 の逆転写からゲノムへの組込みの過程に必要な因子であることも明らかにした。

2009 年 5 月には、以上の 3 つのゲノムワイドな siRNA スクリーニングを含む 9 つの HIV 感染に重要な宿主因子のスクリーニングを対象としたメタ解析が報告された<sup>4)</sup>。驚くべきことに、上記 3 つのスクリーニングの任意の 2 つのスクリーニング間でオーバーラップしていた遺伝子は最大でも 7% 以下であった。考えられる原因としては、実験条件 (使用細胞やウイルス、siRNA 処理の時間、感染を判定するタイミング) や候補遺伝子選定のフィルターの設定の違い、オフターゲット効果などが挙げられる。しかしながら、選択された遺伝子をその機能によってグループ分けしてみると (これを Gene Ontology 解析という)、3 つのスクリーニングで選択された遺伝子は、以下のような共通のグループに属していることが判明した。すなわち、核膜孔・核外 (内) 輸送, DNA 修復, GTP 結合, RNA 結合, ユビキチン関連, mediator 複合体, ER/Golgi 輸送, プロテアソーム複合体, などである。

さらに最近、上記 3 つのスクリーニングの欠点である HeLa (293T) 細胞といった本来の HIV-1 の標的細胞ではない材料を使用していた点を解消するため T 細胞株 (Jurkat 細胞) を使用した shRNA を使用したゲノムワイドなスクリーニングの結果が Yeung らによって報告された<sup>5)</sup>。HIV-1 の本来の標的細胞である初代 CD4 陽性 T 細胞に生理的条件に近いと考えられる Jurkat 細胞<sup>6)</sup> に shRNA ライブラリーを組み込んだレンチウイルスベクターを導入した。shRNA の発現した細胞を選択したのち、複製可能な感染性 HIV-1 クローン (NL4-3) を感染させた。Jurkat 細胞は HIV-1 の感染によって死滅するので、導入した shRNA が HIV-1 感染に必要な宿主因子を十分にノックダウンした場合のみ細胞は生き残ることができる。この方法の特長は、上述した Jurkat 細胞を使用したことのほか、shRNA の発現した細胞を選択することによって、shRNA によるノックダウンが細胞毒性を示す遺伝子を排除できること、siRNA による一時的なトランスフェクションに比べて長期間目的の遺伝子をノックダウンでき半減期の長い蛋白質に対してもウイルス複製への影響を明確に調べることが可能なことなどが挙げられる。54,509 個のヒト転写産物をスクリーニングした結果、まず shRNA 発現による長期的なノックダウンによって細胞毒性を示さなかったクローンが全体の約 20% (9,357) 得られ、このうち HIV-1 の複製・産生を顕著に抑制した遺伝子 252 個が同定された。この 252 個は gene ontology 解析の結果、いくつかの機能的なクラス (酵素結合, GTP 結合, RNA 結合など) に分類された。著者らは、この 252 個からランダムに 22 個を選び出し、1 つの標的に対して 5 つの shRNA を作製し Jurkat 細胞に導入後、HIV-1 複製の抑制活性を調べたところ、約半分の shRNA 導入クローンで 50-90% のウイルス複製抑制が観察された。さら

に、これら抑制活性を示した shRNA を導入した細胞から 9 クローンを選び、CD4 の細胞表面発現が有意に低下していないことも確認した。また、この 9 クローン中 7 クローンについては HIV-1 複製抑制のメカニズムについて予備的実験を行い、HIV-1 の逆転写、転写、Gag 蛋白質の細胞内輸送に影響を与えるものも見出した。このスクリーニング方法の欠点としては、特長としても記載した shRNA によるノックダウンが細胞毒性を示す遺伝子を排除してしまうことで、完全な（または長期的な）ノックダウンが細胞毒性を示す宿主因子の中に HIV-1 複製に必要な（もしくは抑制的に作用する）因子がある場合、そのような因子を取り逃してしまう可能性がある。

以上、HIV-1 複製に必要な宿主因子を探索・同定するために行われてきた 4 つのスクリーニングを紹介してきた。各スクリーニング法の比較を表 1 に示した。いずれのスクリーニング結果も HIV-1 複製に必要な宿主因子に関して有益もしくは新たな情報を提供したが、スクリーニング間でオーバーラップした因子の少なさに見られるように、得られる候補遺伝子は種々の実験条件や結果の選択法によって大きく変動すると考えられ、さらなる方法の改良が必要と考えられる<sup>7)</sup>。shRNA スクリーニングに関していえば、癌研究の分野で試みられている誘導性の shRNA ベクターの使用によって通常の shRNA 導入法ではノックダウンによる細胞毒性によって排除してしまう宿主因子についても評価することができると期待される<sup>8)</sup>。また、応用面では“Synthetic lethal”と呼ばれる通常の siRNA スクリーニングと薬剤処理を組み合わせた方法がある。すなわち、ある特定の遺伝子をノックダウンすることによってごく低濃度の薬剤を併用することによって高濃度の薬剤処理と同等の効果を得ることに成功している<sup>9)</sup>。この方法はすでに使用されている抗 HIV 剤や毒性が高くて使用できなかった薬剤についても適用できるかもしれない。

## HIV 複製を制御する宿主因子を探索するためのその他の方法

### 1. 機能的ゲノムワイド HIV 耐性遺伝子スクリーニング

siRNA (shRNA) によるスクリーニングは主に HIV 複製に必要な宿主因子の探索・同定の方法であるが、これとは対照的に主に HIV 複製に耐性を示す宿主因子の探索・同定に用いられている方法である。レンチウイルスベクターに組込んだ cDNA ライブラリーを T 細胞株に導入・安定発現させ、HIV-1 感染後生存した細胞から HIV-1 耐性遺伝子を同定する<sup>10)</sup>。これまで、この方法論で CD63 の N 末欠損変異体が HIV-1 のコレセプターの一つ CXCR4 の形質膜への輸送を阻害すること<sup>11)</sup> や、Brd4 の C 末端領域が Tat に依存した HIV-1 LTR からの転写を抑制すること<sup>12)</sup> などが明らかにされた。

### 2. HIV 感染・非感染細胞を用いた遺伝子発現プロファイルの網羅的解析

この方法論は、HIV 感染によって特異的にその発現が上昇（もしくは減少）する遺伝子を同定し、それらを HIV 複製に関与する宿主因子同定のためのプローブとして研究を進めようという試みである<sup>13-15)</sup>。この試みから最近 SOCS1 とよばれるサイトカインのシグナル伝達に関わることが知られている蛋白質が HIV-1 Gag 蛋白質の細胞内輸送とその安定性に寄与していることが明らかにされ、まだ十分に解明されていない HIV-1 の粒子形成過程に貴重な知見を付け加えた<sup>16,17)</sup>。

### 3. HIV 感染・非感染細胞またはウイルス粒子を用いた蛋白質発現プロファイルの網羅的解析

このアプローチもやはり、HIV 感染によって特異的にその発現が上昇（もしくは減少）する遺伝子産物（蛋白質）または HIV 粒子に取り込まれている宿主因子を同定し、それらを HIV 複製に関与する宿主因子同定のためのプローブとして研究を進めようという試みである<sup>18-21)</sup>。ウイルス感染によって特異的にその発現が上昇（もしくは減

表 1 ゲノムワイドな siRNA (shRNA) スクリーニングの比較

スクリーニング	標的細胞	ウイルス	siRNA 処理時間 (h)	抗ウイルス活性の判定時間 (h)	ウイルス複製のパラメーター
Brass et al.	HeLa-CD4 CCR5 tat-β-gal	HIV-1 IIIB	72	48 48 (新規感染)	p24 (CA) β-galactosidase 活性
König et al.	293T	VSV-G シュードタイプ HIV-1 Luciferase	48	24	luciferase 活性
Zhou et al.	HeLa-CD4 CCR5 tat-β-gal	HIV-1 HXB2	24	48/96	β-galactosidase 活性
Yeung et al.	Jurkat	HIV-1 NL4-3	shRNA (3 wk)	4 wk	細胞の生死

少)する蛋白質が多数報告されているがその詳細は各文献を照会されたい。報告されたこれらの蛋白質の HIV 複製における役割の解明はこれからの課題である。

## おわりに

以上, HIV-1 複製を制御する宿主因子の探索について機能的ゲノムワイド siRNA (shRNA) スクリーニングを中心に最近の知見を解説した。特に RNAi 関連の実験技術やバイオインフォマティクスの進歩によって, HIV 複製を制御する宿主因子に関する知見は日々蓄積しつつある。それぞれの方法論の改良や各方法の組み合わせによって HIV 複製に関与する因子のさらなる発見とそれに基づいて開発される新たな作用機序を有する抗 HIV 剤の創出が期待される。

## 文 献

- 1) Brass AL, Dykxhoorn DM, Benita Y, Yan N, Engelman A, Xavier RJ, Lieberman J, Elledge SJ : identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science* 319 : 921-926, 2008.
- 2) König R, Zhou Y, Elleder D, Diamond TL, Bonamy GM, Irelan JT, Chiang CY, Tu BP, De Jesus PD, Lilley CE, Seidel S, Opaluch AM, Caldwell JS, Weitzman MD, Kuhlen KL, Bandyopadhyay S, Ideker T, Orth AP, Miraglia LJ, Bushman FD, Young JA, Chanda SK : Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell* 135 : 49-60, 2008.
- 3) Zhou H, Xu M, Huang Q, Gates AT, Zhang XD, Castle JC, Stec E, Ferrer M, Strulovici B, Hazuda DJ, Espeseth AS : Genome-scale RNAi screen for host factors required for HIV replication. *Cell Host Microbe* 4 : 495-504, 2008.
- 4) Bushman FD, Malani N, Fernandes J, D'Orso I, Cagney G, Diamond TL, Zhou H, Hazuda DJ, Espeseth AS, König R, Bandyopadhyay S, Ideker T, Goff SP, Krogan NJ, Frankel AD, Young JA, Chanda SK : Host cell factors in HIV replication : meta-analysis of genome-wide studies. *PLoS Pathog* 5 : 1-12, 2009.
- 5) Yeung ML, Houzet L, Yedavalli VS, Jeang KT : A genome-wide short hairpin RNA screening of jurkat T-cells for human proteins contributing to productive HIV-1 replication. *J Biol Chem* 284 : 19463-19473, 2009.
- 6) Lewinski MK, Bisgrove D, Shinn P, Chen H, Hoffmann C, Hannenhalli S, Verdin E, Berry CC, Ecker JR, Bushman FD : Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol* 79 : 6610-6619, 2005.
- 7) Sharma S, Rao A : RNAi screening : tips and techniques. *Nat Immunol* 10 : 799-804, 2009.
- 8) Ngo VN, Davis RE, Lamy L, Yu X, Zhao H, Lenz G, Lam LT, Dave S, Yang L, Powell J, Staudt LM : A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 441 : 106-110, 2006.
- 9) Whitehurst AW, Bodemann BO, Cardenas J, Ferguson D, Girard L, Peyton M, Minna JD, Michnoff C, Hao W, Roth MG, Xie XJ, White MA : Synthetic lethal screen identification of chemosensitizer loci in cancer cells. *Nature* 446 : 815-819, 2007.
- 10) Kawano Y, Yoshida T, Hieda K, Aoki J, Miyoshi H, Koyanagi Y : A lentiviral cDNA library employing lambda recombination used to clone an inhibitor of human immunodeficiency virus type 1-induced cell death. *J Virol* 78 : 11352-11359, 2004.
- 11) Yoshida T, Kawano Y, Sato K, Ando Y, Aoki J, Miura Y, Komano J, Tanaka Y, Koyanagi Y : A CD63 mutant inhibits T-cell tropic human immunodeficiency virus type 1 entry by disrupting CXCR4 trafficking to the plasma membrane. *Traffic* 9 : 540-558, 2008.
- 12) Urano E, Kariya Y, Futahashi Y, Ichikawa R, Hamatake M, Fukazawa H, Morikawa Y, Yoshida T, Koyanagi Y, Yamamoto N, Komano J : Identification of the P-TEFb complex-interacting domain of Brd4 as an inhibitor of HIV-1 replication by functional cDNA library screening in MT-4 cells. *FEBS Lett* 582 : 4053-4058, 2008.
- 13) Ryo A, Suzuki Y, Ichiyama K, Wakatsuki T, Kondoh N, Hada A, Yamamoto M, Yamamoto N : Serial analysis of gene expression in HIV-1-infected T cell lines. *FEBS Lett* 462 : 182-186, 1999.
- 14) van 't Wout AB, Lehrman GK, Mikheeva SA, O'Keefe GC, Katze MG, Bumgarner RE, Geiss GK, Mullins JI : Cellular gene expression upon human immunodeficiency virus type 1 infection of CD4(+)-T-cell lines. *J Virol* 77 : 1392-1402, 2003.
- 15) Mitchell R, Chiang CY, Berry C, Bushman F : Global analysis of cellular transcription following infection with an HIV-based vector. *Mol Ther* 8 : 674-687, 2003.
- 16) Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Kimura R, Komano J, Nishi M, Soeda H, Hattori S, Perrem K, Yamamoto M, Chiba J, Mimaya J, Yoshimura K, Matsushita S, Honda M, Yoshimura A, Sawasaki T, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N : SOCS1 is an inducible host factor during HIV-1 infection and regulates the intracellular trafficking

- and stability of HIV-1 Gag. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 : 294-299, 2008.
- 17) Nishi M, Ryo A, Tsurutani N, Ohba K, Sawasaki T, Morishita R, Perrem K, Aoki I, Morikawa Y, Yamamoto N : Requirement for microtubule integrity in the SOCS1-mediated intracellular dynamics of HIV-1 Gag. *FEBS Lett* 583 : 1243-1250, 2009.
- 18) Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, Bess JW, Jr, Sowder RC, 2nd, Barsov E, Hood BL, Fisher RJ, Nagashima K, Conrads TP, Veenstra TD, Lifson JD, Ott DE : Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol* 80 : 9039-9052, 2006.
- 19) Chan EY, Qian WJ, Diamond DL, Liu T, Gritsenko MA, Monroe ME, Camp DG, 2nd, Smith RD, Katze MG : Quantitative analysis of human immunodeficiency virus type 1-infected CD4+ cell proteome : dysregulated cell cycle progression and nuclear transport coincide with robust virus production. *J Virol* 81 : 7571-7583, 2007.
- 20) Ringrose JH, Jeeninga RE, Berkhout B, Speijer D : Proteomic studies reveal coordinated changes in T-cell expression patterns upon infection with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 82 : 4320-4330, 2008.
- 21) Chan EY, Sutton JN, Jacobs JM, Bondarenko A, Smith RD, Katze MG : Dynamic host energetics and cytoskeletal proteomes in human immunodeficiency virus type 1-infected human primary CD4 cells : analysis by multiplexed label-free mass spectrometry. *J Virol* 83 : 9283-9295, 2009.