

課題番号 : 25指108
研究課題名 : DNA損傷によって増加するマクロファージへのHIV-1感染機序の解明と応用
主任研究者名 : 石坂幸人
分担研究者名 : なし
キーワード : HIV-1、インテグラーゼ、マクロファージ、DNA 損傷、新規抗エイズ薬
研究成果 :

1 : インテグラーゼの DNA 損傷部へのリクルートメントに関与する宿主細胞側因子の同定

[背景] 先行研究で、HIV-1 インテグラーゼが不活化された状態でも、低い頻度ながら感染性を示すことや、このインテグラーゼ活性非依存的なウィルス感染は特に静止マクロファージにおいて、DNA 損傷で促進されることが報告された。また、HIV-DNA は DNA 二重鎖切断 (DSB: DNA double-strands break) 部位へ挿入されることも明らかとなっている (Koyama *et al.*, 2013)。本研究では、DSB 誘導活性を示す HIV 蛋白質である Vpr が、どのような機序で静止マクロファージへのウィルス感染に関与するのかについて、DSB 誘導機序から理解する。

[結果] インテグラーゼの DSB 部位への集積 : 図 1A は、ホーミングエンドヌクレアーゼである I-PpoI により *DABI* 遺伝子座位を切断した際の、インテグラーゼの同 DSB 部位へのリクルートを ChIP アッセイで評価した結果を示す。EGFP-IN と Cherry-LacR-Vpr を用いた FRAP 法を用いた解析により Vpr 存在下においてインテグラーゼが Micro-irradiation により誘導した DSB 部位へと迅速に集積することが明らかとなった (図 1B)。さらに DSB シグナル伝達経路の阻害剤を用いて同様の解析を行った結果、ATM、DNA-PKcs のような DSB シグナル伝達の最上流因子の活性には Vpr の DSB 部位への集積は依存しておらず、Vpr 自身の活性や DSB のセンサータンパクが重要であることが示唆された (図 1C)。

2 : Vpr と Topo-I の機能的関連性の証明

[背景] Vpr を培養細胞で発現させると、DNA 二重鎖切断が誘導される。しかし、Vpr 自身にはヌクレアーゼ活性が無いことから、宿主蛋白質機能を介して DSB を誘導していることが示唆される。一方、昨年度の解析で、Vpr 結合因子として、DNA のトポロジーを変化させる Topoisomerase1 (以下 Topo1) を同定し、両者が直接的に結合することや、Topo1 の発現のウィルス感染における意義を解析した。

[結果] **A.** HIV 感染者の中には、感染後長期間に亘ってエイズを発症しない、所謂、Long-term non-progressor (LTNP) が認められる。LTNP の一つの原因として、Vpr の 77 番目のアルギニンがグルタミンに変異した R77Q 変異ウィルスの関与が報告されている。今回の解析で、R77Q 変異体 Vpr (Vpr/R77Q) は Topo1 との結合性を示さないこと、また、Vpr/R77Q を細胞に処理した場合、DSB 自体の生成は野生型 Vpr と同程度に認められるが (図 2A)、野生型 Vpr と比較して DSB シグナルの誘発が低下することを認めた。即ち、Vpr は Topo1 非依存的に DSB 自身を誘導していることが示唆された。**B.** Topo1 の HIV 感染における役割 : Topo1 に対する siRNA 導入下でのウィルス感染効率を評価した結果、有意に感染効率が減少した (図 2B)。また、Vpr による DSB 誘発に伴って惹起される Topo1 の分解に関与する宿主側因子について siRNA を用いて抑制すると、顕著なウィルス感染効率の低下が認められた。即ち、Vpr/Topo1 を介した DSB 誘導はウィルス感染において重要な役割を示す持つことが強く示唆された。さらに Vpr による DSB がウィルス DNA 挿入の直接の標的となるのかを明らかにするために、U2OS/2-6-3 細胞株 (Lac0 リピート安定導入細胞) に Cherry-LacR-Vpr をトランスフェクションにより導入し、その後、Vpr/インテグラーゼ欠損 HIV-1 ウィルスを感染させたところ、Vpr が集積し DSB が誘導される Lac0 リピート中へのプロウィルス DNA 挿入が確認された (図 2C)。さらに、Cherry-LacR-Vpr をウィルス粒子中に取り込ませたレンチウィルスを作成し、U2OS/2-6-3 細胞に感染させた場合においても同様に、Lac0 リピート中へのプロウィルス DNA の顕著な挿入頻度の増加が認められた。以上の結果は HIV-1 感染時において Vpr が誘導する DSB がウィルス DNA の挿入標的となることを強く示唆するものである。

Subject No. : 25A108
Title : The mechanism of DNA damage induced HIV-1 infection and its application
Researchers : Yukihito Ishizaka
Key word : HIV-1, Integrase, Macrophage, DNA damage, novel AIDS drug
Abstract :

1. Identification of cellular factor(s) which involved in recruitment of IN to DSB site.

[Background] We are focusing on the mechanism of integrase (IN) catalytic activity independent HIV infection, which is stimulated by DNA damage induction. Previously, we reported that proviral DNA integrated at site of DNA double strand break (DSB site), implying that the cellular machinery directing HIV DNA to the DSB sites. Here, we decided to identify the cellular factor(s) regulating the recruitment of HIV DNA at DNA damage site. The finding from this study will provide the novel target for anti-HIV drug development.

[Results] A. Utilizing the two methodologies, that is ChIP assay and FRAP assay, we demonstrated the recruitment of IN to DSB sites. First, in ChIP assay, ectopically expressed IN protein was accumulated on *DAB1* locus, which contains I-*Ppo* I recognition site, after I-*Ppo* I expressed adenovirus infection. Second, in FRAP analysis with EGFP-IN and Cherry-LacR-Vpr, we found that IN was quickly accumulated to the micro-irradiation created DSB tracks in a Vpr dependent manner. Furthermore, the Vpr recruitment to DSB tract was also observed under the inhibition of ATM and DNA-PKcs, the central factors of DSB signaling, implying the involvement of the DSB sensor proteins or the activity of Vpr in quick recruitment of Vpr/ IN to DSB site.

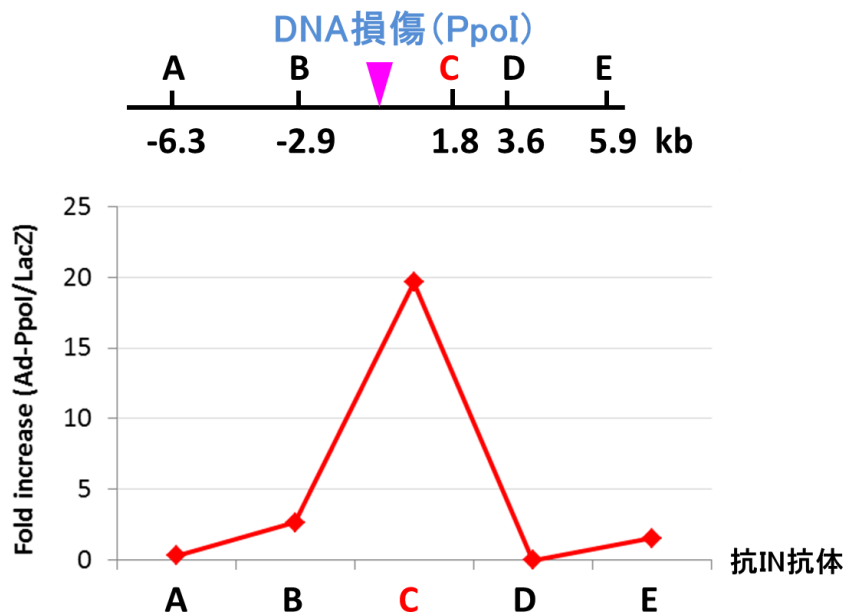
2. Functional association of Vpr and Topo1

[Background] Vpr induces DSB on cellular genomic DNA. Because Vpr protein itself has no nuclease activity, it is plausible that Vpr induced DSB depends on the cellular machinery. We identified topoisomerase1 (Topo1), which induces the topological changes on dsDNA, as a novel Vpr associating factor. We found that Vpr directly associated with Topo1, and significant decrease of Vpr induced DSB under the Topo1 downregulated condition. Here we investigated role of Topo1 for viral integration.

[Results] A. By analyzing the mode of association between Vpr and Topo1, we identified that Vpr/R77Q mutant, the mutation of which was identified in virus in long term non-progressor of HIV-positive patients, did not bind Topo1. Although the similar level of DSB was observed in cells that expressed Vpr/R77Q and wild-type Vpr, Vpr/R77Q was less potent for triggering cellular DSB signals. Data suggest that Vpr induces DSB in Topo1-association independent manner. **B.** For investigating the importance of Topo1-Vpr interaction on HIV infection, we analyzed the viral infectivity with siRNA application. By downregulation of Topo1 and Topo1-induced DSB signal associated factors, the viral infectivity was significantly reduced, strongly suggesting the critical role of Topo1 mediated Vpr-induced DSB on the viral infection. **B.** The IN- and Vpr-defective HIV infection to the LacO repeat transduced cell following the transient expression of Cherry-LacR-Vpr, demonstrated the proviral integration to LacO sites. Thus, Vpr induced DSB can play roles in viral infection through creating the viral DNA integration target site.

図1.インテグラーゼのDNA損傷部へのリクルートメントに関する宿主細胞側遺伝子産物の同定

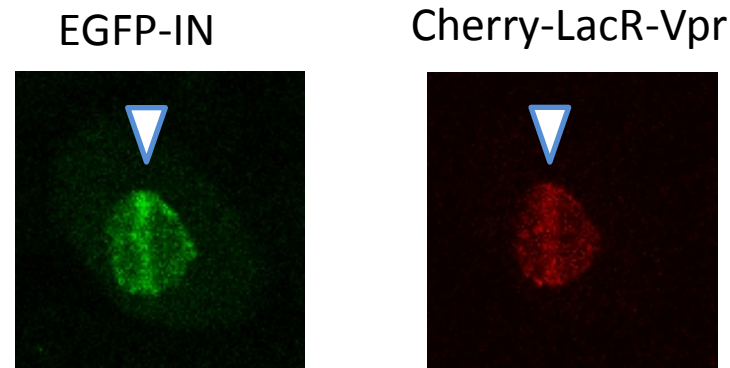
A. INはDSB部位に集積する (ChIP assay)



- Ku55933: ATM阻害剤
- Nu7026: DNA-PKcs阻害剤

B. INのDSB部位へのリクルート (Micro-irradiation)

(Micro-irradiation) ▽ : DSB track



C. VprのDSB部位へのリクルート解析

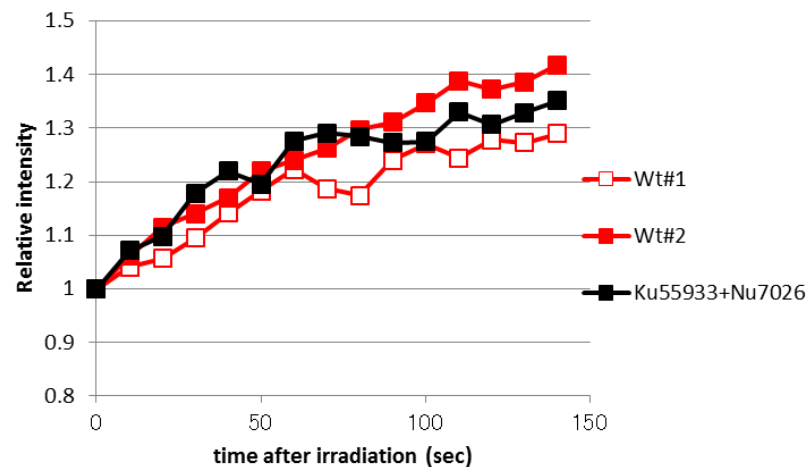
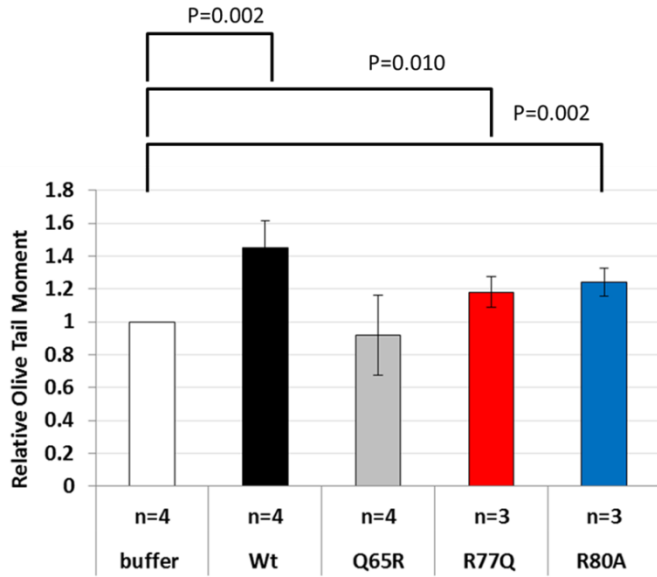
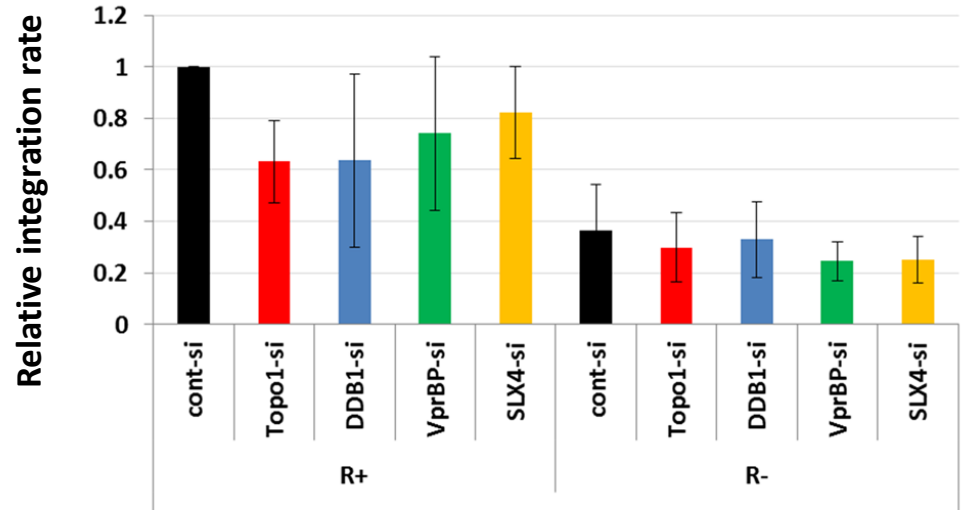


図2. VprとTopo-Iの機能的関連性の証明

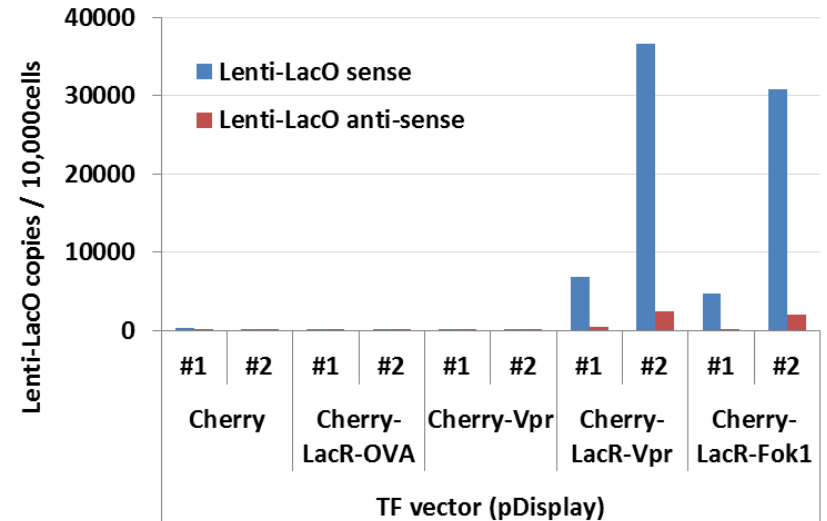
A. Comet assay によるDSB産生の解析



B. Topo1、およびTopo1関連因子 ノックダウン時のHIV感染効率



C. Vpr集積部位へのウイルスDNA挿入頻度



- Cherry-LacR-Vpr: LacO 指向性Vpr導入
 - Cherry-LacR-Fok1: LacO指向性Fok1*導入
- *Fok1: ヌクレアーゼ

研究発表及び特許取得報告について

課題番号：25指108

研究課題名：DNA損傷によって増加するマクロファージへのHIV-1感染機序の解明と応用

主任研究者名：石坂幸人

論文発表

論文タイトル	著者	掲載誌	掲載号	年
Evaluation of Thermo-triggered Drug Release in Intramuscular-transplanted Tumors using Thermosensitive Polymer-modified Liposomes and MRI	Kokuryo D, Nakashima S, Ozaki F, Yuba E, Chuang KH, Aoshima S, Ishizaka Y, Saga T, Kono K, Aoki I.	Nanomedicine	11:229-38	2015
Human immunodeficiency virus type 1 Vpr increases hepatitis C virus RNA replication in cell culture.	Deng A, Chen C, Ishizaka Y, Chen X, Sun B, Yang R.	Virus Res.	184:93-102	2014
Retrotransposition of long interspersed element 1 induced by methamphetamine or cocaine.	Okudaira N, Ishizaka Y, Nishio H.	J. Biol. Chem	289:25476-85	2014
Retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 is associated with colitis but not tumors in a murine colitic cancer model.	Otsubo T, Okamura T, Hagi T, Ishizaka Y, Kawamura T, Dohi T.	PLoS ONE	1:e0116072	2014
Identification of novel autoantibodies to GABA-B receptors in patients with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus.	Tsuchiya H, Haga S, Takahashi Y, Ishizaka Y, Mimori A	Rheumatology (Oxford)	53:1219-28	2014
A novel ACE2 activator reduced monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing the JAK/STAT and TGF-β cascades with restored caveolin-1 expression.	Haga S, Tsuchiya H, Mimori A, Ishizaka Y	Exp Lung Res	41:21-31	2015

学会発表

タイトル	発表者	学会名	場所	年月
HIV-1 VprによるDNA二重鎖切断誘導機構	飯島健太、石坂幸人	第16回白馬シンポジウム	熊本	2014年6月
膠原病血管病態における抗ACE2抗体のACE2阻害作用：Ang(1-7)定量による方法	高橋裕子、芳賀しおり、石坂幸人、三森明夫	日本リウマチ学会総会	名古屋	2015年4月

その他発表(雑誌、テレビ、ラジオ等)

タイトル	発表者	発表先	場所	年月日
Roles of DNA Damage and its Cellular Response in the Transduction of Human Immunodeficiency Virus-1	Kenta Iijima and Yukihito Ishizaka,	HIV Advance Research and Development,	著書	2014年8月1日

特許取得状況について ※出願申請中のものは()記載のこと。

発明名称	登録番号	特許権者(申請者) (共願は全記載)	登録日(申請日)	出願国
なし				

※該当がない項目の欄には「該当なし」と記載のこと。

※主任研究者が班全員分の内容を記載のこと。