

論文内容の要旨

論文題目

shRNA による HIV-1 の長期抑制効果と分子メカニズムの検討

(Retroviral delivery of promoter-targeted shRNA induces long-term silencing of HIV-1 transcription)

氏名 山岸 誠

背景

AIDS の原因ウイルスである HIV は、複雑な構造を持つレトロウイルスで、世界中に蔓延し、現在も人類の脅威となっている。近年、多剤併用療法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy, HAART) の有効性が示されて以来、HIV 感染症に対する治療は新たな局面を迎えている。HAART により AIDS による死亡数は減少に転じている一方で、副作用や費用の面で問題が浮き彫りとなり、また HIV 潜伏感染細胞を完全に除去するに至らないことが明らかとなってきた。また、日本が先進国で唯一、感染者数が増加しているという背景は、HIV/AIDS に対する新たな治療法の確立が重要であることを示している。

このような状況の中、siRNA による遺伝子発現制御を用いた新たな治療法が現在注目され、新たな創薬としての可能性が示唆されている。しかし、HIV はその生活環から高頻度に変異が入ることが知られており、HIV 遺伝子の多様性による抑制効果の減弱や、また標的細胞への導入法など、課題は多く残されている。

siRNA/miRNA による遺伝子発現抑制には様々なメカニズムが存在する。標的 mRNA の分解や翻訳抑制が広く研究されている一方で、遺伝子のプロモーター領域に相補的な siRNA が転写抑制に関わることが近年報告された。この Transcriptional gene silencing (TGS) は、プ

ロモーター領域 DNA を相補的な siRNA が認識し、エピジェネティックな変化を介して転写を制御することが示唆されているが、詳細なメカニズムは不明な点が多い。

私は以上の背景から、(1) HIV-1 に対する新たなアプローチとして、HIV-1 のプロモーター領域に対する shRNA を設計し、HIV-1 の複製に対する抑制効果について検討を行う、(2) 抑制効果における分子メカニズムについて解析を行う、ことを目的として博士課程の研究を行った。

方法及び結果

HIV-1 のプロモーター (U3 region of 5'LTR) には NF- κ B 結合配列がタンデムに 2 つ並んだ配列が存在する。私はこの領域に対する shRNA を設計し (sh κ B)、HIV-1 の標的細胞である T 細胞に導入する為にレトロウイルスベクターを構築し、shRNA 発現細胞を樹立した (Molt-4/sh κ B)。この細胞に対して HIV-1 NL4-3 株を感染させ、ウイルスの複製レベルを観察したところ、耐性株が出現せず、1 年以上ウイルスの増殖を完全に抑制した。そこでこの抑制効果の作用機序を知るために感染細胞の解析を行ったところ、sh κ B は HIV-1 の遺伝子発現を劇的に減少させること、そしてその抑制効果は時間経過に依存して増強されることがわかった。さらに Nuclear run-on assay、Luciferase reporter assay の結果、sh κ B は LTR からの転写を直接抑制することによりウイルス複製を阻害していることがわかった。

次に shRNA の標的配列や構造と HIV-1 抑制効果の関係について検討を行った。HIV-1 のプロモーター上の Sp1 結合配列に対する shRNA (shSp1) による抑制効果との比較を行った結果、sh κ B のみに長期抑制効果が見られた。また siRNA の構造と HIV-1 の抑制効果を検討した結果、Hairpin 構造を持つ形で発現させることが、長期抑制に重要であることがわかり、本研究で構築した抑制系は HIV-1 を安定的に抑制する良い候補であると考えられた。

HIV-1 の治療を考える上でバリアの 1 つとなっているのが、潜伏化したウイルスである。潜伏化の分子メカニズムには不明な点が多いが、エピジェネティックな遺伝子発現抑制が報告されている。潜伏化 HIV-1 に対する sh κ B の抑制効果について検討するため、HIV-1 潜伏感染細胞株である ACH2、OM10.1 に sh κ B 発現レトロウイルスベクターを導入し、再活性化実験を行った。その結果、sh κ B は未刺激における抑制効果と同時に、TNF- α の刺激による HIV-1 遺伝子の再活性化レベルを低下させることから、sh κ B は潜伏感染したウイルスに対しても抑制的に働くことがわかった。

プロモーターに相補的な siRNA による転写抑制にはエピジェネティックな変化を介していることが複数報告されている。そこで sh κ B によって抑制されている HIV-1 の再活性化を行ったところ、TSA による刺激によりウイルス遺伝子の発現上昇がみられたことから、sh κ B により標的配列周辺に HDAC がリクルートされることが示唆された。一方で DNA のメチ

ル化阻害剤である 5-AzaC による影響は見られず、このことは Bisulfite genomic sequencing 法による解析結果と一致した。Chromatin immunoprecipitation (ChIP)法によるヒストンの化学修飾状態を調べた結果、H3K27 のトリメチル化が誘導されていることがわかった。さらに、抑制から一ヶ月後には H3K27me3 の増強に伴い、H3K9 のメチル化が誘導され、ヘテロクロマチン化が進むことが明らかになった。このことは shkB による HIV-1 複製の長期抑制と遺伝子発現抑制の結果と一致する。また HIV-1 増殖抑制に寄与しない shSp1 ではヒストンのメチル化が誘導されておらず、ヒストンのメチル化と抑制効果の相関性が示唆された。

これまでの報告から、siRNA や miRNA による gene silencing の key factor として知られる Argonaute (Ago)タンパク質が、TGS においても重要な役割を果たしていると考えられる。ChIP assay の結果から、HIV-1 LTR に対する shRNA により H3K27 のトリメチル化が誘導されることが明らかとなったが、さらに解析した結果、shkB により LTR 上に Ago1 と、H3K27 のメチル化酵素である EZH2 がリクルートされていることが分かった。これらの因子について解析したところ、免疫染色の結果から Ago family の中で特に Ago1 が核内にも存在することがわかった。そして Ago1 と EZH2 は核内で共局在し、さらに Co-immunoprecipitation の結果、Ago1 と EZH2 は核内において複合体を形成すること、また RNase 処理の結果から、この相互作用は RNA に依存しないことが分かった。

一方 Ago1 と EZH2 はそれぞれ核内で RNA duplex と共局在することが明らかとなり、さらに HMT assay の結果から、この Ago1 complex に H3K27 のメチル化活性があることが分かった。以上のことから、siRNA と結合した Ago1 が核内で標的プロモーター上にリクルートされ、さらにヒストンメチル化酵素 EZH2 を標的領域上にガイドすることによって、転写抑制を誘導することが示唆された。

最後に、TGS における EZH2 の役割を解析するために、EZH2 ノックダウン細胞の樹立し、これを用いて LTR-luciferase reporter による EZH2 の機能解析を行った。NF- κ B binding site に相補的な dsRNA による TGS 誘導の結果、TGS には EZH2 が重要であることがわかった。このことから、siRNA による TGS は EZH2 によって標的配列周辺のヒストンのメチル化を導入することによって引き起こされることが示された。

考察

本研究の成果は、HIV/AIDS に対する新たな戦略を提案する。HIV-1 をはじめとするウイルスの構造遺伝子に対する siRNA の研究も進み、その有効性と同時に限界も示された。本研究での siRNA の新たな利用法は、従来の siRNA の問題点を克服する可能性をもつものである。LTR に相補的な shRNA はヒストンのメチル化を介して転写を抑制し、1 年以上に渡りウイルス複製を阻害した。またレトロウイルスベクターによるデリバリーは細胞内で安

定的に shRNA を発現させるために重要であると考えられる。

プロモーターに相補的な siRNA による転写制御は、植物や酵母で知られていた機構であり、最近になり哺乳類にも保存されていることがわかった。しかし生物種により転写抑制誘導の分子機構が異なること、また抑制マーカが異なることなどから、哺乳類での詳しいメカニズムについては現在急速に研究が進められている。

本研究結果から、TGS の誘導には Ago1 が核内においてプロモーター上に作用すること、ヒストンのメチル化には EZH2 が重要であることを示し、さらに不活性化マーカには H3K27 と H3K9 のメチル化がリンクしており、複雑な転写抑制機構の存在を明らかにした。これらの研究結果は同時に、small RNA による新たな遺伝子発現調節の分子メカニズムの一端を明らかにしたものである。small RNA と Polycomb group による新たな遺伝子発現抑制メカニズムの存在の可能性が示唆される。

本研究は、HIV-1 のプロモーターに対して shRNA を作用させることにより、1 年間以上ウイルスの増殖を抑制できることを示した。以上の結果はウイルス学的に非常に重要な進展であり、またその分子機構の解明はより有効な抑制システムの構築と同時に、分子生物学的知見に大きく貢献するものであると考えられる。