

Unintegrated HIV DNA サイレンシングの HIV 複製サイクルにおける意義

Exploring the role of silencing of unintegrated HIV DNA in HIV replication cycle

所属機関：INSTITUTE OF HUMAN GENETICS 代表研究者氏名：町田 晋一

研究期間：2021 年 4 月 1 日～2022 年 3 月 31 日

滞在研究機関：Institute of human genetics (CNRS, France)

141, rue de la Cardonille, 34396 Montpellier - Cedex 5, France

共同研究者等：Dr. Monsef Benkirane

Early in HIV life cycle, HIV RNA genome is reverse transcribed into a double-stranded HIV DNA. HIV DNA is then delivered into the nucleus, and integrated into the human genome by the HIV integrase protein, forming the provirus. However, a portion of HIV DNA is not integrated (uinDNA), and is rapidly silenced. This mechanism is common in retroviruses, but the molecular mechanism and biological significance of this silencing is still unclear. In this study, we identified POLE3 protein as the HIV-1 uinDNA silencing factor by the Proteomics of Isolated Chromatin segments (PICH) method and the siRNA screening using HIV-1 integrase mutant. Knockdown and knockout experiments demonstrated POLE3 is transcriptional repressor of uinHIV-1 DNA with marginal effect on expression from integrated provirus, unintegrated Murine Leukemia Virus, and plasmid DNA. Remarkably depletion of POLE3 impairs HIV replication, suggesting transcriptional repression of uinDNA is beneficial for HIV-1 replication.

研究目的

現在までに、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 薬が研究開発されてきた。そして、それらを組み合わせて投薬する多剤併用療法により、HIV 感染者のエイズ発症を阻止することが実現した。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。そのため、HIV 複製サイクルのメカニズムの更なる解明が、画期的な HIV 治療法の開発に必要である。

HIV-1 が細胞に感染すると、その遺伝情報である HIV-1 RNA をもとに、逆転写によって HIV-1 DNA が新規に合成される。その後、HIV-1 DNA は細胞核内に侵入し、ヒトのゲノムにインテグレーションされる。しかし、一部の HIV-1 DNA は宿主ゲノムにインテグレーションされず (uinDNA)、速やかに転写不活化される。このサイレンシング機構は他のレトロウイルスにおいても共通である。しかし、サイレンシングの分子機構の詳細および生物学的意義は明らかになっていない。興味深いことに、静止期の CD4 T 細胞において、宿主ゲノムに組み込まれていない

HIV-1 uinDNA は安定に保持され、さらに潜伏感染再活性化剤によって複製可能な HIV-1 を産出する。また、HIV-1 uinDNA はヒトのゲノムにインテグレーションされた HIV-1 DNA と同じ遺伝子および制御要素を含んでいる。しかし、HIV-1 感染における HIV-1 uinDNA サイレンシングの意義は明らかになっておらず、HIV-1 uinDNA の本質的な理解は HIV-1 感染制御に重要な知見を与える。そこで、本研究では、HIV-1 uinDNA のサイレンシング機構および HIV 複製サイクルにおける意義を解明するを目指した。

研究経過

本研究では、HIV-1 uinDNA のサイレンシング機構および HIV-1 複製サイクルにおける意義を明らかにするために、サイレンシング因子の同定を試みた。まず、特定の DNA 配列に相互作用する因子を網羅的に同定する方法 (Proteomics of isolated chromatin segments (PICH)法)により、HIV-1 uinDNA に集積する因子を同定した。具体的には、HIV-1 LTR 領域に相補的な RNA プローブを用いて、細胞核内のクロマ

チンから HIV-1 uinDNA を特異的にプルダウンし、質量分析法により HIV-1 uinDNA に結合する因子を 459 種類同定した。続いて、インテグラーゼの活性部位に変異を有する HIV-1 IND116A を用いた siRNA スクリーニングにより、uinDNA サイレンシングに機能する因子として POLE3 を同定した。

POLE3 は POLE4 と複合体を形成し、ヒストンシヤペロンとして機能することが知られている。そこで、POLE3 および POLE4 のノックダウンした HeLa 細胞を用いて、POLE3 および POLE4 の HIV-1 uinDNA サイレンシング能を評価した。その結果、POLE3 および POLE4 が HIV-1 uinDNA サイレンシングに機能することが明らかになった。次に、POLE3 および POLE4 が直接 uinDNA のサイレンシングに機能することを明らかにするために、POLE3/POLE4 の uinDNA への集積を解析した。具体的には、HIV-1 IND116A を感染させた HeLa 細胞を用いて、POLE3/POLE4 抗体を用いた Cut&Run/ChIP 解析を行った。その結果、POLE3/POLE4 が HIV-1 uinDNA 上に集積することが明らかになった。さらに、POLE3/POLE4 による uinDNA サイレンシングが転写レベルにて引き起こされることを新生 RNA 沈降法により解析した。その結果、POLE3/POLE4 ノックダウンにより、HIV-1 uinDNA からの転写の顕著な亢進が観察された。また、HIV プロモーターおよびエンハンサーを含む LTR 上のエピゲノムを解析したところ、POLE3 ノックダウンにより、LTR 上における活性化ヒストンマーク H3Ac 及び RNA ポリメラーゼ II の集積の亢進が観察された。これらの結果から、POLE3 は転写レベルにて HIV-1 uinDNA サイレンシングに機能することが明らかになった。

次に、より生体内に近い条件での POLE3 の uinDNA サイレンシング能を解析するために、ヒトの末梢血から精製した初代 CD4T 細胞を用いて、POLE3 の uinDNA サイレンシング能を評価した。具体的には、POLE3 をターゲットとした siRNA をエレクトロポレーション法により CD4T 細胞に導入し、POLE3 の uinDNA サイレンシング能を解析した。その結果、POLE3 は培養細胞だけではなく、初代 CD4 細胞においても uinDNA サイレンシングに機能することが明らかになった。

次に、POLE3 依存的なサイレンシングの特異性を評価した。具体的には、インテグレーションされた HIV 遺伝子の発現、および他のレトロウイルス

Murine Leukemia Virus (MLV) の uinDNA の発現への影響を評価した。その結果、POLE3 はインテグレーションされた HIV 遺伝子および MLV uinDNA の発現にほとんど影響を及ぼさないことがわかった。また、HIV 遺伝子を含むプラスミド DNA の発現への影響を解析したところ、POLE3 は HIV 遺伝子を含むプラスミド DNA の発現に影響を及ぼさないことがわかった。これらの結果は、POLE3 が逆転写によって新規に合成された HIV-1 uinDNA を特異的にサイレンシングすることを示唆する。

次に、HIV-1 uinDNA サイレンシングの HIV-1 複製サイクルにおける意義を解明するために、POLE3 をノックアウトした T 細胞由来の SupT1 細胞にて、HIV-1 複製サイクルを長期にわたって観察した。本解析では、POLE3 を完全にノックアウトした SupT1 細胞を樹立することができなかったが、部分的にノックダウンした細胞を樹立することに成功した。また、これら POLE3 ノックダウン細胞では、HIV-1 uinDNA からの発現が亢進した。次に、これら細胞を用いて、replication competent HIV の複製サイクルを観察した。具体的には、培養液に放出された HIV 粒子量(p24)を測定することで HIV-1 複製を評価した。解析の結果、POLE3 ノックアウト細胞において、HIV-1 複製が抑制されることが明らかになった。また、CD4 受容体を安定発現した HeLa 細胞を用いて、POLE3 ノックアウト細胞を樹立し、POLE3 欠損の HIV-1 複製サイクルへの影響を解析した。その結果、SupT1 細胞で観察された結果と同様に、POLE3 欠損により HIV-1 複製が抑制されることが明らかになった。一方で、POLE3 欠損細胞にて産出された HIV virion の成熟およびその感染性を解析したところ、POLE3 欠損の影響はほとんど見られなかった。

以上の結果から、POLE3 は HIV-1 uinDNA のサイレンシングに機能すること、さらには、POLE3 欠損は HIV 複製サイクルを抑制することが明らかになった。

考察

本研究により、HIV-1 uinDNA サイレンシング因子として POLE3 を同定した。また、POLE3 が HIV-1 uinDNA に集積し、転写レベルにて HIV-1 uinDNA サイレンシングに機能することが明らかになった。また、そのサイレンシング能は培養細胞だけでなく、ヒトの末梢血から精製した初代 CD4T 細胞にて観

察された。

本研究課題を遂行中に、別のグループから、HIV-1 *unDNA* サイレンシング因子として SMC5-6 複合体および CAF1 複合体が同定された(Dupont et al., *Cell Host & Microbe*, 2021, Geis et al., *PNAS*, 2022)。我々のグループでは、SMC5-6 複合体および CAF1 複合体に関しても、POLE3 と同様の解析を行った。特に、プラスミド DNA を用いた解析から、SMC5-6 複合体および CAF1 複合体は、外来の DNA を非特異的にサイレンシングすることがわかった。一方で、興味深いことに、POLE3 は逆転写後の新規の HIV-1 *unDNA* を特異的にサイレンシングする。この結果は、HIV-1 *unDNA* に結合した HIV 由来のタンパク質群が POLE3 の集積に関与していることを示唆する。よって、HIV 由来のタンパク質群と POLE3 の相互作用解析により、POLE3 によるサイレンシング機構の更なる理解が進むと期待される。

POLE3 欠損細胞を用いた HIV-1 複製サイクルの解析により、POLE3 が HIV-1 複製サイクルに必要であることが明らかになった。一方で、POLE3 欠損細胞から産出された HIV-1 virion は正常に成熟およびその感染性が維持されていたことから、POLE3 による HIV-1 *unDNA* のサイレンシングが HIV-1 複製サイクルに必要であることが示唆された。一方で、本研究により、POLE3 は逆転写後の HIV-1 *unDNA* を特異的にサイレンシングすることが明らかになった。これらの結果は、インテグレーション前の HIV-1 *unDNA* のサイレンシングはインテグレーションを保証するために必要である可能性を示唆する。よって、HIV-1 *unDNA* のサイレンシングによる HIV インテグレーション制御の理解が、HIV-1 *unDNA* のサイレンシングの意義の解明に必要なになると考える。

参考文献

1. Dupont, L. et al. The SMC5/6 complex compacts and silences unintegrated HIV-1 DNA and is antagonized by Vpr. *Cell Host and Microbe* 1–21 (2021) doi:10.1016/j.chom.2021.03.001.
2. Geis, F. K. et al. CHAF1A/B mediate silencing of unintegrated HIV-1 DNAs early in infection. *Proc National Acad Sci* 119, e2116735119 (2022).

研究の発表

口頭発表

1. ○Shinichi Machida, Suzie Thenin-Houssier, Lucie Bonnet, Jérôme Dejudin, Moncef Benkirane. Characterization of unintegrated HIV-1 DNA silencing. The 2021 Cold Spring Harbor meeting: Retroviruses, Virtual (2021)

誌上発表

該当なし

