

博士論文

HIV-1 潜伏感染成立及び維持における  
宿主エピジェネティック制御因子 **PRC2** の機能研究

松田有加



目次

ページ

要旨	1
諸言	2
材料と方法	12
培養細胞	
PBMC の分離と培養	
阻害剤	
Dual-color-reporter の作製	
レンチウイルスベクターの作製	
Flocytometry 解析	
gDNA 抽出と PCR	
RNA 抽出と RT-PCR	
クロマチン免疫沈降法 (ヒストン修飾)	
クロマチン免疫沈降法 (転写因子)	
ノックダウン用 shRNA 発現レトロウイルスベクターの作製	
Western blot 法	
Single-round HIV 作製	
レポーターアッセイ	
Tat のトランスフェクション	
Table 1: dual-color reporter 作製に用いた primer	
Table 2: DNA PCR に用いた primer	
Table 3: RT-PCR に用いた primer	
Table 4: ChIP assay に用いた primer	
Table 5: shRNA の作製に用いた合成オリゴ DNA 配列	
Table 6: 抗体リスト	
結果	24
I. 潜伏化モデル dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の作製と検証	
1. 潜伏化モデル dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の作製	
2. Dual-color-reporter(LTR-Tat/empty-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の一過的発現の解析	
3. Dual color reporter(LTR-Tat/empty-IRES-Venus-ef-1-mRFP)stable 導入細胞での発現の解析	
4. レポーター導入 Jurkat 細胞での LTR 活性の経時変化の解析	

- II. レポーター導入系を用いた潜伏化成立メカニズムの解析
  - 1. 感染初期の LTR のプロモーター活性の解析
  - 2. 感染直後に LTR が抑制された集団の解析
  - 3. 感染直後の LTR 抑制に関わるエピジェネティック制御の解析
  - 4. 宿主エピジェネティック制御因子 Polycomb repressive complex 2(PCR2)の感染初期の LTR 活性への影響の解析
  - 5. PCR2 knockdown の細胞への影響の解析
  - 6. Single-round HIV 感染系を用いた潜伏化モデルの作製
  - 7. PCR2 の感染初期のウイルス遺伝子発現への影響の解析
  - 8. 活性化された LTR の経時的な抑制におけるエピジェネティック制御の役割
  - 9. 経時的な LTR 活性の抑制における PCR2、HDAC の役割の解析
- III. 成立メカニズムの異なる潜伏感染細胞集団の違いについて
  - 1. LTR 上のエピジェネティック制御の違いの解析
  - 2. LTR 活性化刺激・エピジェネティック制御因子阻害剤への応答性の違い
- IV. 潜伏感染モデル HeLa/LTR-luciferase を用いた Tat の LTR 活性化能への PCR2 の影響の解析
  - 1. HeLa/LTR-luciferase 細胞での PCR2 の LTR 抑制能の解析
  - 2. PCR2 の Tat の LTR 活性化能への影響の解析
- V. 慢性感染細胞 U1 での PCR2 の LTR 抑制への影響の解析
  - 1. U1 細胞でのウイルス発現レベルと LTR 上の H3K27me3 レベルの関係
  - 2. HDAC 阻害剤によるウイルス発現の誘導時の LTR 上の H3K27me3 レベルの変化
  - 3. U1 における PCR2 の LTR 抑制について
  - 4. LTR 上での PCR2 の他のヒストン修飾への影響の解析
- VI. PCR2 の LTR 局在メカニズムの解析
  - 1. U1 細胞における YY1 ノックダウンの影響の解析

考察・・ 44

- 1. 潜伏化成立モデル dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の利点と欠点
- 2. 潜伏化成立に関わる LTR 活性の 2 つの抑制経路について
- 3. 同様のレポーター導入系との比較
- 4. 感染初期の LTR 抑制におけるエピジェネティック
- 5. LTR 活性の経時的な抑制における宿主エピジェネティック制御の役割について
- 6. 潜伏化成立への他のウイルス遺伝子の影響の解析
- 7. 感染細胞集団中に heterogeneity を形成する要因について
- 8. 生体内での潜伏感染細胞集団中の heterogeneity の存在について

- 9. 感染直後の PRC2 による LTR 活性の制御と Tat による転写制御の関連について
- 10. PRC2 の LTR 局在メカニズムについて
- 11. HDAC 阻害剤、PRC2 阻害剤共処理による潜伏化ウイルスの再活性化と潜伏感染成立の阻害の可能性について

結論 . . . . . 67

謝辞 . . . . . 68

図表 . . . . . 69

参考文献 . . . . . 94

## 要旨

Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV-1)はヒトレトロウイルスであり、体内で CD4 陽性 T 細胞、樹状細胞、マクロファージ、マイクログリア細胞などに感染する。感染細胞ではウイルスタンパク質の細胞毒性により細胞死が誘導されるため、感染者体内では CD4 陽性 T 細胞が減少し、免疫不全状態が引き起こされる。HIV はほとんど細胞で溶解感染を起こすが、一部の細胞では慢性感染が成立することが知られている。このような細胞は潜伏感染細胞と呼ばれ、ウイルス遺伝子の発現が転写レベルで抑制されていることが報告されている。この潜伏感染細胞は個体レベルでの感染の初期に起こっていることが報告されており、活性化 T 細胞の一部がメモリー T 細胞になる際に成立すると想定されている。しかし感染細胞内での感染から慢性感染成立の過程におけるウイルス遺伝子の発現制御は十分明らかにされていない。細胞レベルでのウイルス遺伝子発現抑制のメカニズムがこれまで明らかにされてこなかった主な要因としては、ウイルス遺伝子の発現が抑制された感染細胞を識別することが困難であること、体内での潜伏感染細胞の頻度が低いこと、の 2 点が挙げられる。本研究では感染細胞内でのウイルス遺伝子の発現制御の解析に特化した独自のレポーターである **dual-color-reporter** を作製し、ウイルス遺伝子の発現が抑制されるメカニズムを解析した。

**Dual-color-reporter** 感染系を用いた解析から、感染初期において HIV 遺伝子のプロモーターである **5'LTR** の活性が抑制されている感染細胞が存在することが明らかとなった。感染初期の **LTR** の活性強度の異なる集団の比較から、この感染初期の抑制には宿主のエピジェネティック制御因子による **LTR** 上の修飾の違いが関わっていることが明らかとなり、特にヒストン **H3** リジン **27** のトリメチル化修飾とそのレベルを制御する **Polycomb repressive complex 2 (PRC2)** が感染初期の抑制に重要であることが明らかとなった。**PRC2** による感染初期の **LTR** の抑制は、より HIV 野生株に近い **single-round HIV** を用いても検証された。

また dual-color reporter を用いた解析から、感染初期の LTR の活性が強い感染細胞の集団においても、長期培養によって LTR の活性が抑制されることが明らかとなり、この抑制過程にも宿主のエピジェネティック制御が関与していることが明らかとなった。

また本研究では異なるメカニズムで成立した2つの潜伏感染細胞集団間には LTR 上のエピジェネティック制御のレベルや LTR の再活性化刺激への応答性に違いがあることを明らかにした。この結果から、潜伏感染細胞集団中に再活性化への応答性が異なる heterogeneity が存在することが示唆された。

本研究では感染細胞内での HIV 遺伝子発現制御の解析に特化したレポーター系の作製により、HIV の遺伝子の発現抑制のメカニズムが2通りであること、その過程に宿主のエピジェネティック制御が関わることを明らかにした。さらに抑制メカニズムの違いによって性質の異なる感染細胞集団が成立することが明らかとなり、潜伏感染細胞の成立に関わる新しい知見が得られた。

## 諸言

### HIV について

ヒト免疫不全ウイルス(Human Immunodeficiency virus type1)は、レトロウイルス科レンチウイルス属に分類される。1983年に免疫不全の患者から分離され、1984年に後天性免疫不全症候群(AIDS)の原因ウイルスであることが同定された(Spire et al., 1984)。

最新の国連合同エイズ計画 (UNAIDS) の報告によると、2012年の時点で全世界の HIV-1 感染者数は 3400 万人 (3190 万人から 3590 万人) であると推定されている。流行の程度には地域差があるものの、15 歳から 49 歳の成人の 0.8%が HIV に感染していることになる。また新規感染者数は年 220 万人から 280 万人と推定されており、2001 年の新規感染者数と比較すると約 20%減少しているが、依然として社会に大きな影響を与えている感染症の一つである(UNAIDS report 2012)。

### 抗 HIV 薬の開発と多剤併用療法について

抗 HIV 薬の開発は精力的に行われており、1987年に最初の抗 HIV 薬である逆転写酵素阻害剤、Zidovudine(AZT)が開発されて以降、HIV 複製の様々な過程を標的とした抗 HIV 薬が開発されている。現在までに核酸系逆転写酵素阻害剤、非核酸系逆転写酵素阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、インテグラーゼ阻害剤、CCR5 阻害剤の 5 種類のクラスの約 30 種類の薬剤が開発されており、これらの複数を組み合わせた多剤併用療法が行われている。多剤併用療法の導入以降、エイズ関連疾患による死亡者数は減少傾向にある(UNAIDS report 2012)。抗 HIV 薬の開発や衛生環境の向上によって HIV 感染症の位置づけは死に至る病から、慢性疾患に変わったと言える。多剤併用療法によってウイルスの新規感染と複製を効果的に防ぐことが可能であり、血中のウイルス RNA のレベルを検出限界である 50copies/ml 以下に保つことが出来る(Perelson et al., 1997)。し



かし抗 HIV 薬療法では体内から完全にウイルスを排除することは出来ず、抗 HIV 薬服用の中断によってウイルス RNA の発現がリバウンドすることが報告されている(Chun et al., 1999)。ウイルス血症の再発を抑えるために感染者は抗 HIV 薬を一生涯に渡り服用しなければならず、耐性ウイルス出現のリスク、副作用、医療費の負担などが新たな問題となっている。

#### 抗 HIV 薬療法による *In vivo* のウイルス量の変動と感染細胞の体内への残存について

抗 HIV 薬服用による血中ウイルス RNA 量の減少は、大きく 4 相に分けられる。まず第一相では、血中のウイルス粒子の分解と HIV 感染活性化 CD4 陽性 T 細胞の死滅によって、治療開始 2 週間以内に血中のウイルス RNA 量が急激に減少する。続いて第二相では、半減期が比較的長いマクロファージ、部分的に活性化した CD4 陽性 T 細胞、樹状細胞の死滅によって穏やかに減少する。

第三相、第四相では寿命が長い感染細胞の死滅により血中のウイルス RNA が減少する。樹状細胞の寿命は組織や細胞の種類によって異なることが知られている。骨髄樹状細胞は *in vitro* での HIV 感染後も 45 日以上生存することが報告されている(Popov et al., 2005)。しかし抗 HIV 薬療法開始 6 週間後には骨髄樹状細胞からプロウイルスは検出されないことから、この細胞が長期に渡り残存し、ウイルスを保持している可能性は低い(Coleman and Wu, 2009)。ランゲルハンス細胞は擦過傷や他の性感染症の病原体とともに暴露された場合にのみ、HIV 感染に感受性を示し、感染した場合の半減期は約 15 日であると考えられている(Smith et al., 2001)。またリンパ節の存在する濾胞樹状細胞は、細胞表面に HIV のウイルス粒子を感染後数カ月に渡り捕捉することが報告されている。しかしこのウイルス粒子が抗 HIV 薬療法を長期にわたって継続している患者の体内において、ウイルス血症再発時のウイルスの供給源として寄与しているかは不明である。

最も長期間に渡り体内に残存し、ウイルス血症再発時のウイルスの供給源となってい

る感染細胞はメモリーCD4 陽性 T 細胞であると考えられている。この細胞の半減期は 44 か月と長く、恒常的な分裂によって発現が抑制されたプロウイルスを長期間に渡り保持する。抗 HIV 薬服用中断によるウイルス血症再発時のウイルス RNA の配列には分子進化が起きていないことから、潜伏感染メモリーCD4 陽性細胞が再発するウイルス血症の主なウイルス供給源であると考えられている(Bailey et al., 2006)。メモリー T 細胞には二次リンパ組織に局在するセントラルメモリーT細胞と末梢血中に存在するエフェクターメモリーT細胞が存在し、この 2 つの集団の存在により同じ抗原が侵入してきた際には迅速に免疫応答を発動することを可能にしているが、抗 HIV1 薬療法中の患者由来の末梢血単核球 (PBMC) を解析したところ、末梢血の HIV 感染 CD4 陽性 T 細胞のうち、98%がメモリー細胞であり、その内訳としては 52%がセントラルメモリーT細胞、34%がトランジショナルメモリーT細胞、14%がエフェクターメモリーT細胞、2%が Naïve T 細胞であることが報告されている(Chomont et al., 2009)。この報告もメモリーT細胞が抗 HIV 薬療法下でウイルスを保持していることを示している。

潜伏感染細胞の存在頻度は末梢血中の CD4 陽性 T 細胞の  $10^6$  の 6 乗個に 1 個であると推定されており、体内全体にも  $10^6$  個程度しか存在しない(Chun et al., 1997)。しかしこの細胞の半減期は 44 か月と長いため、抗 HIV 薬の服用によって新規感染を完全に防ぐことが可能であると仮定しても、体内から全ての感染細胞を除去するのに約 60 年かかるかと推定されている。

また抗 HIV 薬療法下でも体内にウイルスが残存する機構としては、薬が透過できない中枢神経系や腸管関連リンパ組織における検出限界以下のウイルスの複製が考えられている(Chun et al., 2008; Gras and Kaul, 2010)。

#### 潜伏感染細胞でのウイルス遺伝子の発現抑制の分子メカニズム

潜伏感染細胞での HIV 遺伝子発現の抑制メカニズムとしては、様々な *in vitro* の潜

伏化モデルを用いて研究が行われてきた。大きく 5 つのメカニズムに分類される。

### 1. プロモーター干渉

HIV はレトロウイルスであり、宿主のゲノムに挿入した自身のプロウイルスから、5'LTR 配列をプロモーターエンハンサーとして利用して遺伝子発現を行う。このため HIV 遺伝子の発現はインテグレーションサイト近傍の宿主ゲノムの配列の影響を受ける。HIV のインテグレーションサイトを網羅的に解析した研究からは一般的に HIV のインテグレーションは転写が活発な領域に多いことが報告されている (Schroder et al., 2002a)。宿主の強力なプロモーターの下流に HIV プロウイルスが同じ転写方向に挿入された場合には HIV 遺伝子の readthrough が起こる (Greger et al., 1998)。このようなインテグレーションサイトでの転写抑制は HIV の調節タンパク質である Tat や TNF- $\alpha$  処理による NF- $\kappa$ B 経路活性化によって解除される (Lenasi et al., 2008)。また近傍に逆方向のプロモーターが存在する場合には RNA pol II 複合体の衝突が起こり、宿主遺伝子と HIV 遺伝子両方、または往路モーター活性の弱い遺伝子の転写伸長が止まる (Lewinski et al., 2005)。

### 2. 転写開始

HIV-1 LTR の U3 領域には NF- $\kappa$ B, NFAT, Sp-1, AP-4 などの宿主の転写因子結合サイトが存在する。これまで、NF- $\kappa$ B, NFAT が HIV LTR に結合できること (Kinoshita et al., 1998)、NF- $\kappa$ B の結合が HIV の転写に大きな影響を与えること (Kim et al., 2011)、Sp1 が HIV の遺伝子発現に不可欠であること (Perkins et al., 1993) が報告されている。またこれまで LTR 上の転写因子結合配列の変異体などを用いた研究から、LTR 上の Sp1 sites と  $\kappa$ B sites の変異によって、潜伏化が誘導されること (Burnett et al., 2009)、転写開始点以降の AP-4 サイトが潜伏化の成立に重要であることを示されている (Duverger et al., 2013)。NF- $\kappa$ B, NFAT は休止状態の T 細胞では細胞質に局在しているが、細胞が活性化すると核内に移行し、転写因子としての活性を示す。NF- $\kappa$ B の p50

RelA のヘテロダイマーはヒストンアセチル化酵素である p300/CBP を LTR にリクルートし(Zhang et al., 2011)、DNA とヒストンの親和性を変化させ転写を誘導する。このような HIV の転写開始に関わる宿主因子の発現や活性のレベルが HIV の潜伏化に影響することが考えられている。

### 3. 転写伸長

HIV の調節タンパク質である Tat は HIV 遺伝子の転写伸長において重要な役割を果たす。HIV の転写開始点からは TAR RNA と呼ばれる 55 から 59nt の short RNA が転写される(Kao et al., 1987)。この TAR RNA は Tat と相互作用し、HIV LTR の転写開始点の下流で停滞している RNA pol II の周辺に転写伸長因子である P-TEF-b をリクルートする(Wei et al., 1998)。Primary CD4 陽性 T 細胞を用いた研究から、P-TEFb の不足は HIV の遺伝子発現の抑制に関わることが報告されている(Tyagi et al., 2010a)。

### 4. エピジェネティック制御

一般的に遺伝子の発現は、染色体上のその遺伝子をコードする領域のクロマチンの構造変化の影響を受ける。クロマチンは 4 種類のヒストンタンパク質 (H2A,H2B,H3,H4) の 8 量体に 147bp の DNA が巻きついた構造をもっている。凝集したクロマチン構造はヘテロクロマチンと呼ばれるが、遺伝子をコードしているユークロマチン領域では遺伝子の発現制御に合わせて、クロマチン構造の弛緩した状態と条件的ヘテロクロマチンの状態を移行している。このようなクロマチンの構造は DNA のメチル化、ヒストンタンパク質のアセチル化、メチル化、ユビキチン化を含むヒストン化学修飾などのエピジェネティック制御により変化する。宿主のゲノムに挿入したプロウイルスから遺伝子発現を行う HIV も宿主のエピジェネティック制御の影響を受けることが報告されている。HIV の 5' LTR 配列には様々な宿主の転写因子の結合配列が存在することが知られているが、これまでに NF- $\kappa$ B p50 のホモダイマー、CBF-1、Sp1、LSF と YY1、AP-4 と c-Myc を介して HDAC が LTR にリクルートされ、HIV 遺伝子

の発現抑制に関わることが報告されている(He and Margolis, 2002; Jiang et al., 2007; Tyagi and Karn, 2007; Williams et al., 2006)。また近年ゲノムワイドなヒストン化学修飾と遺伝子発現の解析が多数行われており、ヒストンメチル化修飾と転写の関係が明らかにされてきている。HIV の転写に関しても、H3K9me3 を制御する Suv39H1、H3K9me2 を制御する G9a と H3K27me3 を制御する EZH2 が LTR のプロモーターの活性に影響し HIV の潜伏化に関与することが報告されている(du Chene et al., 2007; Friedman et al., 2011; Imai et al., 2010)。

またプロモーター領域の DNA のメチル化は遺伝子の発現抑制に関わることが知られている。LTR とその近傍の配列には 11 か所の CpG サイトが存在し、このサイトでの DNA のメチル化が LTR プロモーター活性の抑制に関わることが報告されている(Blazkova et al., 2009; Ishida et al., 2006)。

## 5. Tat の活性

Tat は HIV の転写伸長によって、HIV の遺伝子発現を劇的に増加させる。Tat の活性は 50 番目、51 番目のリジン残基のアセチル化修飾によって制御されることが報告されており、このアミノ酸残基の変異体は LTR 活性化能が低いことが報告されている(Ott et al., 2004)。また慢性感染細胞である U1 細胞では 2 つのプロウイルスのうち、1 つはナンセンス変異、もう一方には 13 番目のヒスチジン残基がロイシンに置換された変異 (H13L) があり、LTR 活性が抑制されることが報告されている(Emiliani et al., 1998)。

HIV の逆転写酵素の精度は低く、複製の過程で多くの変異が生じる。ウイルスの複製の過程で生じた Tat の弱毒化変異がウイルス遺伝子の発現抑制に関わると考えられている。実際、抗 HIV 薬治療中の感染者の CD4 陽性 T 細胞から分離されるウイルス RNA の解析から、Tat に弱毒化変異が蓄積していることが報告されている(Yukl et al., 2009)。

## HIV 完全治癒に向けた取り組みについて

抗 HIV 薬服用の中断により感染者の **quality of life** を向上させるために、体内からの HIV の完全排除を目指した取り組みが基礎研究レベル、臨床レベルで研究されている。主な例としては、①ウイルスの複製を減少させるための治療薬の強化、治療開始時期の早期化、②潜伏感染細胞でのウイルスの再活性化と抗 HIV 薬の併用による体内の感染細胞の減少、③治療ワクチンによる HIV 特異的 CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、中和抗体の誘導、④骨髄移植や遺伝子治療による CCR5 の発現低下による新規感染の抑制などがある。

これらの取り組みの中でも、潜伏感染細胞でのウイルス遺伝子発現抑制機構の解析から得られた知見を元に提案された戦略が、**purging regimen** と呼ばれる治療コンセプトである。**Purging regimen** は様々な方法により潜伏感染ウイルスを活性化させ、感染細胞の死滅、細胞障害性 T 細胞(CTL)による排除、抗 HIV 薬による新規感染の阻害により感染者体内の感染細胞集団のサイズ縮小しようとするコンセプトである。これまでに *in vitro* で潜伏感染細胞を用いて、IL-2、IL-2+INF- $\gamma$ 、IL-2+OKT(anti-CD3 抗体)、HDAC 阻害剤の処理によって潜伏化ウイルスの再活性化を誘導できることが報告されている。しかし抗 HIV 薬と IL-2、ART と IL2+INF- $\gamma$ を併用する免疫活性化療法は細胞増殖を誘導し、新たな感染の標的となる細胞を増やしてしまうという欠点があり、体内の潜伏感染細胞集団を縮小することは出来なかった。また CD3 抗体の投与では感染者の T 細胞を枯渇させてしまうという大きな副作用があった(Geeraert et al., 2008)。そこで潜伏化した HIV の転写を活性化する HDAC 阻害剤が注目されている。HDAC 阻害剤は①感染細胞の種類によらずに幅広い細胞に対して作用し、潜伏化した HIV-1 の転写を活性化することができる。②さまざまな subtype の HIV-1 の転写を活性化することができる、③新しい感染の標的細胞を増殖させることがない、また HIV-1 の感

染の co-receptor となる CXCR4 の発現レベルを亢進させない。④すでに他の複数の疾患に対する治療薬としてヒトでの安全性が実証されている。などの利点がある。

また近年、抗 HIV 薬の服用によって長期間に渡り血中のウイルス RNA が検出限界以下に保たれた患者に HDAC 阻害剤の投与したところ、CD4 陽性 T 細胞内でのウイルス RNA の発現が活性化すること報告され、purging regime による潜伏化ウイルス再活性化の可能性が *in vivo* でも示された(Archin et al., 2012)。しかしこれらの purging regimen と多剤併用療法によって感染者体内の reservoir size を縮小することが可能であるかは十分明らかにされていない。

#### 潜伏化成立のメカニズムについて

上記のように、これまで様々な潜伏感染モデルを用いて HIV の遺伝子発現抑制のメカニズムが明らかにされてきた。しかしこのような抑制状態に至る過程のメカニズムは十分明らかにされていない。この主な要因として①潜伏感染細胞を識別する細胞表面マーカーなどが存在せず、非感染細胞と潜伏感染細胞の識別が困難であること、②体内での潜伏感染細胞の成立頻度が  $10^6$  個に 1 個と非常に低いことの 2 点が挙げられる。

潜伏感染細胞の成立に関して、これまでに得られている知見としては、以下の 2 つの報告がある。潜伏感染成立に関して想定されているメカニズムとしては、ART 療法中の感染者の PBMC のプロウイルスの解析から、メモリー CD4 陽性 T 細胞にプロウイルスが多く検出されることから、メモリー CD4 陽性 T 細胞の成立時に潜伏感染が成立すると考えられている(Chomont et al., 2009)。Naïve T 細胞は抗原刺激により活性化され増殖するとともに抗原の排除に働く。活性化された T 細胞の多くは 2~3 週間以内に死滅するが、一部の活性化 T 細胞は再び休止状態に戻り、メモリー T 細胞として免疫記憶を担う。この過程で HIV は細胞内で潜伏化し、恒常的増殖によって長期間に渡って体内に残存すると考えられている。また naïve T 細胞にダイレクトに感染することも想

定されている。また個体レベルでの潜伏化成立の時期に関しては、ART の開始時期や服用期間と潜伏感染細胞の頻度には相関関係が見られなかったこと感染の初期に ART を開始しても潜伏感染細胞は成立したことから、感染直後に潜伏感染は成立していると考えられている(Chun et al., 1998)。一方で細胞レベルでの潜伏化成立メカニズムの詳細な解明は行われていない。

これまでに既に成立した reservoir を排除するための治療戦略は考案されてきた。一方で体内の Reservoir size を縮小するためには、体内の潜伏感染細胞が成立するメカニズムを知ることが重要であると考えられる。細胞レベルでの潜伏化成立に関わる知見は、将来的には潜伏化成立メカニズムを標的とした新たな治療戦略の確立に貢献するものと期待される。

本研究では、感染初期から慢性感染成立の過程でウイルス遺伝子の発現がどのように制御されているか明らかにするために、独自の dual-color-reporter 導入系を作製した。Dual-color-reporter は LTR をプロモーターとして Venus を発現し、下流の EF-1 プロモーターを利用して別の蛍光タンパク質である mRFP を発現する構造をもつ。mRFP は感染細胞のトレーサーとして利用することで、LTR の活性が抑制された感染細胞を可視化することが出来る。本研究ではこの dual-color-reporter を用いて、感染から慢性感染成立までのウイルス遺伝子の発現変化を解析すること、潜伏化成立過程での宿主エピジェネティック制御の役割を明らかにすることを目的とした。



## 材料と方法

### 培養細胞

Jurkat(T lymphocyte)、Molt4(T lymphoblast)、SupT1(T lymphoblast)、CCRF-CEM(T lymphoblast)、U1(HIV-1 infected promonocyte)の各細胞株を RPMI 10 %FBS 添加培地で、37 °C、5 %CO<sub>2</sub>条件下で培養した。

293T,293FT、HeLa/LTR-luciferase は 10%FBS 添加 Dulbecco 変換培地で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### PBMC の分離と培養

健常者から採取した末梢血に Ficoll-Paque(GE health care)を等量重層し、1500rpm で 30 分遠心分離し、末梢血単核球を分離する。PBS で洗浄後、PHA (10ng/ml)を含む 10%FBS RPMI で培養し、T 細胞を幼弱化させる。48 時間後に PHA を除去し、10<sup>6</sup> 細胞/100μl の濃度に細胞を調整し、12 well plate にまきなおし、recombinant Il-2(10ng/ml)を含む 10% FBS RPMI で培養する。レンチウイルスベクターを感染させた後は、96well plate にて 10<sup>6</sup> cell/100μl/1well で培養し、薬剤処理などのアッセイを行った。Well の半分の培地(50μl)を 2 日に一度交換し、継代した。

### 阻害剤

DZNep(3-Deazaneoplanocin A),Cayman から購入した。DMSO で 5mM に懸濁した後-20°Cで保存し、100nM から 5mM の濃度で培地に添加する。GSK126(ChemieTek から購入)は DMSO で 5mM に懸濁した後、-20°Cで保存し、100nM から 5mM の濃度で培地に添加する。SAHA (Cayman から購入)は DMSO で 5mM に懸濁した後、-20°Cで保存し、500nM から 1μM の濃度で培地に添加する。VPA(Sigma から購入)は 1M でミリ Q に懸濁後、-20°Cで保存し、1mM から 2.5mM の濃度で培地に添加する。

### Dual-color-reporter の作製

LTR 配列は single-round HIV 感染 Molt4 由来の DNA を鋳型にクローニングした。また Tat は HIV-1 NL4-3 株感染 Molt4 細胞の cDNA を鋳型にクローニングした。理化学研究所三好先生より供与していただいた CS II -EF-MCS-IRES2-Venus から Age I site を利用して EF-1 promoter を切り出した。このベクターにクローニングした LTR 配列を Age I site を利用して挿入した。作製した CS II -LTR-MCS-IRES2-Venus の Multi Cloning Site の Not I site と BamH1 site を利用してクローニングした Tat を挿入した。Tat 欠損レポーターの作製には何も挿入していないものを利用した。このベクターは single-color-reporter としても利用した。CS II -LTR-Tat/empty-IRES2-Venus ベクターを鋳型として LTR から Venus までの配列を、各末端に Sal I、Xba I を付加して増幅し、pENTER4-H1 ベクターにサブクローニングした。pENTER4-LTR-Tat/empty-IRES2-Venus を Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) によって CS-RfA-EF-mEFP1 ベクターに組み換え、CS-LTR-Tat/empty-IRES2-Venus-EF-1-mRFP を作製した。CS II -EF-MCS-IRES2-Venus、CS-RfA-EF-mEFP1、pENTER4-H1 のベクターマップは理化学研究所バイオリソースセンター三好先生のものレンチウイルスベクタープラスミド提供リストを参照。[http://www.brc.riken.jp/lab/cfm/Subteam\\_for\\_Manipulation\\_of\\_Cell\\_Fate\\_J/Plasmid\\_List\\_J.html](http://www.brc.riken.jp/lab/cfm/Subteam_for_Manipulation_of_Cell_Fate_J/Plasmid_List_J.html))レポーターの作製に用いた primer は Table 1 に示した。

### レンチウイルスベクターの作製

10mm dish に  $2 \times 10^6$  細胞の密度で 293FT をまき、24 時間後に CS-LTR-Tat/empty-IRES2-Venus-EF-1-mRFP 8 $\mu$ g、pCAG HIV gp 5 $\mu$ g、pCMV-VSV-G 5 $\mu$ g をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションし、4~6 時間以

内に培地を交換し、培養を継続した。トランスフェクション後 72 時間で培養上清を回収し、0.45 $\mu$ m のフィルターで細胞をろ過した後、8000g で 3 時間から 6 時間の遠心によりウイルスを濃縮し、細胞に導入した。

### Flowcytometry 解析

Dual-color-reporter 導入細胞の Flowcytometry 解析は、 $10^6$  細胞/300 $\mu$ l の濃度で生細胞を FACS buffer(0.3% FBS/PBS)に懸濁し、1 時間以内に行った。mRFP と Venus の発現はホルムアルデヒド固定により衰退することが明らかとなったため、固定処理は行わなかった。

### genomicDNA 抽出と PCR

gDNA は QIAamp DNA Blood Mini Kit(QIAGEN)を用いて、1 サンプルにつき  $1 \times 10^6$  細胞から DNA を抽出した。抽出した DNA は TE で希釈し、50ng/ $\mu$ l の濃度で PCR の鋳型として用いた。検出に用いた primer は Table 2 に示した。

### RNA 抽出と RT-PCR

$1 \times 10^6$  細胞を 1ml の ISOGENE (株式会社ニッポンジーン)に懸濁し、クロロホルム処理によって RNA を抽出した。DNase I 処理によって DNA を分解した後、再度 ISOGENE で懸濁し、クロロホルム処理によって RNA を精製した。SuperScript II (Invitrogen) と Oligo dT primer (Sigma)を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として Acuprime Taq DNA Polymerase System (Invitrogen)を用いて PCR を行った。また SYBR Premix Ex Taq I (TaKaRa)と TaKaRa リアルタイム PCR のシステムを使い、定量的 RT-PCR を行った。リアルタイム PCR に用いたプライマーセットは Table 4 に記載した通りである。

### クロマチン免疫沈降法（ヒストン修飾の検出）

2x10<sup>6</sup> 細胞を 1 %ホルムアルデヒド、37 °C、15 分の条件で固定する。この細胞を PBS で 2 回洗浄した後、1ml の SDS-Lysis Buffer (1 % SDS、10 mM EDTA、50 mM Tris(pH8.0))で懸濁する。超音波装置 (Astreson ultrasonic processor, MISONIX Inc.) を用いて、氷上で 500  $\mu$ l の lysate にパルスを加え、破碎する。(パルスを加える条件はゲノム DNA がヌクレオソーム約 2 個分のサイズになるような条件 (10 秒間 pulse 3、10 秒間隔で累積 100 秒処理) を検討した。) この lysate を 15000 rpm で遠心分離し、不溶性タンパク質などを除いたのち、5 ml の IP Buffer (0.01% SDS、1.1% Triton X-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris(8.1), 16.7mM NaCl) を加え、80  $\mu$ l の Protein G beads と 30 分、4°Cで回転させながらプレクリアーし、非特異的に結合する因子を除く。この Lysate を 1 ml ずつスクリーキャップチューブに分け、抗体を 5  $\mu$ g 分加え、4 °C で回転させながら一晩インキュベートする。(使用した抗体については後述の Table 6 を参照) Protein G beads を 30  $\mu$ l 加え、30 分 4 °C で回転させながらインキュベートした後、6000 rpm、1 分 30 秒間遠心によって Protein G beads を沈殿させ、上清を捨てる。ペレットを ChIP Wash Buffer a (0.1% SDS、1% TritonX-100、2 mM EDTA、20 mM Tris(pH8.0)、150 mM NaCl)を 1ml 加え、20~30 秒間ボルテックスによって攪拌し、再び遠心によって Protein G beads を沈殿させる。以後同じ要領で ChIP Wash Buffer b (0.1 % SDS、1 % Triton X-100、2 mM EDTA、20 mM Tris(pH8.1)、500 mM NaCl)、ChIP Wash Buffer c (0.25 M LiCl、1 % NP-40、1 % Sodium Deoxycholate、1 mM EDTA、10 mM Tris(pH8.0))で洗浄したのち、TE で 2 回沈殿を洗浄を行い、非特異的に免疫沈降された DNA を除去する。250  $\mu$ l の Elution Buffer (1% SDS、0.1 M NaHCO<sub>3</sub>)を加え、15 分インキュベートを 2 回繰り返す、溶出する。溶出後の計 500  $\mu$ l のサンプルに、5 M NaCl を 20 $\mu$ l 加え、65 °C で 4 時間以上インキュベートすることにより脱クロスリンク反応を行う。その後、0.5 M EDTA 10  $\mu$ l と 1M Tris HCl (pH6.5)

20  $\mu$ l と 10 mg/ml Proteinase K solution 2  $\mu$ l を加え、42  $^{\circ}$ C で 1 時間以上反応させ、ヒストンを分解する。このサンプルからフェノール/クロロホルム処理によって DNA を抽出し、50  $\mu$ l の TE に溶かし、リアルタイム PCR の鋳型とする。ChIP assay の検出に使用したプライマーは Table 3 に記載した。

免疫沈降後のサンプルから抽出した DNA に含まれる標的配列の Input 中のパーセンテージを計算し、control IgG で IP したサンプル中の標的配列のパーセンテージで補正し、Relative enrichment として表記した。Fig.9 B は 2 回の実験の representative data を示した。Fig.16 B は 1 回の ChIP assay の結果から得られた傾向を示した。Fig.20 B のグラフは 3 回の実験の Relative enrichment の平均と標準偏差を示した。Fig.21 B C は 3 回の実験の representative data を示した。

#### クロマチン免疫沈降法（転写因子の検出）

転写因子に対するクロマチン免疫沈降実験には Simple ChIP Enzymatic Chromatin IP Kit(Magnetic Beads)(Cell Signaling)を用いた。前項に記載したヒストン修飾の ChIP assay との主な違いはクロマチンの断片化を micrococcal nuclease 処理により行い、物理的な衝撃によるエピトープの損傷を防いだ点である。

#### ノックダウン用 shRNA 発現レトロウイルスベクターの作製

標的遺伝子特異的な shRNA を発現させるためのオリゴ DNA を pSINsi-hU6 DNA(TaKaRa)を参考に設計した。また shRNA 部分の配列は既に報告されている論文で使用され、高いノックダウン効率を得られることが知られている siRNA の配列を参考に作製した。shRNA 発現ベクターの作製に用いたオリゴ DNA の配列は Table 5 に記載した。このオリゴ DNA をアニーリングさせた後、DNA ligase I を用いて pSINsi-hU6 DNA にライゲーションした。ライゲーション液をコンピテントセルに加

え、トランスフォーメーションし、アンピシリン入り LB プレートで 37 °C、16 時間培養した。得られたコロニーから、アルカリプレップ法によってプラスミドを精製した。このプラスミドを *BamHI* と *AvrII* によって消化し、インサートが挿入されていることを確認した。また挿入された配列に変異が入っていないことを DNA sequencing によって確認した。このプラスミドをラージスケールで培養し、アルカリプレップ法で抽出した後、セシウムクロライドによって精製した。

作製した pSINsi-hU6 shRNA vector を、レトロウイルスの骨格タンパク質を発現する pGP、pE-ampho と LA2000 (Invitrogen)を用いて 293T 細胞へ共導入した。4 時間後と 24 時間後に培地を交換したのち、導入 48 時間後の培養上清を回収し、0.45 µm pore size のフィルターによってろ過し、リコンビナントウイルスを精製した。

### Western blot 法

前日に 50 %コンフルエントの状態にまき直した細胞を用意する。細胞を PBS で洗浄後、1 ml の RIPA Buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5)、1% NP-40、0.1 % Sodium Deoxycholate、0.1 %SDS、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1mM PMSF、1mM Trasyrol) でサンプルを溶かし、7 回ピペッティングし、15 分以上氷上でインキュベートする。その後 15 分間 4 °C で回転させながらインキュベートし、15000 rpm、10 分間遠心分離し不溶性タンパク質を除く。3xSample Buffer を加え、95 °C、5 分煮沸し変性させる。1well あたり  $2 \times 10^5$  cell になるようにサンプルをアプライする。150 mA、約 2 時間、7.5 %または 10 % SDS-PAGE する。Transfer Buffer (3.03 mg/ml Tris、14.14 mg/ml Glycine、10 % Methanol、0.05 % TritonX-100)中で PVDF メンブレンにゲルを wet transfer 装置で 45 V、130 分間転写する。転写後メンブレンを 5 % スキムミルク TBS 中で 4 °C、1 時間ブロッキングする。ブロッキング後、1 次抗体を 5 %スキムミルク TBS で希釈し、ハイブリダイゼーションバック中でメンブレンに一晩反応させる。

TBS-T (TBS、0.5 % TritonX 100)で5分間3回洗浄し、5 %スキムミルク TBS で希釈した alkaline phosphatase の結合した 2 次抗体を 1/2000 に希釈し、室温で 1 時間反応させる。メンブレンを TBS-T で 5 分間 3 回洗浄した後、nitro-blue tetrazolium chloride(NBT) および 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphatase p-Toluidine salt (BCIP)(Promega)を加えた ALP Buffer (100 mM Tris-HCl(pH9 .5)、100 mM NaCl、50 mM MgCl<sub>2</sub>)の中で遮光しながら呈色させる。Western blot に使用した抗体のリストは Table 6 に記載した。発色の停止は、1 %酢酸液にメンブレンを浸したのち、蒸留水に浸すことにより行う。

#### Single-round HIV 作製

Single round HIV 感染系には徳島大学足立昭夫教授より供与していただいた pNL-GFP-Kp を用いた。前日に 10mm dish に  $3 \times 10^6$  の密度でまき直した 293FT 細胞に pNL-GFP-Kp 8.5 $\mu$ g と pCMV-VSV-G 5 $\mu$ g をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションし、4~6 時間後に培地を交換する。トランスフェクション後 48 時間で培養上清を回収し、0.45 $\mu$ m のフィルターで細胞をろ過した後、4 $^{\circ}$ C、8000g で、3 時間遠心し、ウイルス液を濃縮する。ウイルス液は -80 $^{\circ}$ C で保存する。

#### レポーターアッセイ

shSUZ12 及び shSc 発現 HeLa/LTR-Luciferase 細胞を  $4 \times 10^4$  cell/200  $\mu$ l ずつ 48 well plate に播種する。トランスフェクション後 24 時間で氷冷した PBS で細胞を洗浄する。1 $\times$ Luc Lysis Buffer(Promega)を 100  $\mu$ l 加え、ピペティングした。20 分室温でインキュベートしたサンプルを 10  $\mu$ l ずつ 96 well plate にまき、Luciferase の活性は Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)によって測定を行う。

Luc assay に供試したサンプルについて Bladfold 法による Protein assay(Bio-rad)

を行い、タンパク質の濃度を求める。この値で Luc の活性を割り、タンパク質単位濃度あたりの Luc の活性を計算し、補正する。グラフは shSc 発現 HeLa/LTR-Luciferase の活性で shSUZ12 の活性を補正し、Fold activation として表記した。

#### Tat トランスフェクション

shSUZ12 及び shSc 発現 HeLa/LTR-Luciferase 細胞を  $2 \times 10^4$  cell/200  $\mu$ l ずつ 48 well plate に播種し、24 時間後に pME-Flag 付き Tat を LA2000 を用いてトランスフェクションする。4 時間後に培地を交換し、トランスフェクション 24 時間後に Luciferase の活性を測定する。pME-Flag Tat は 1 ng/well、5 ng/well、10 ng/well、20 ng/well と濃度を振って導入する。Tat のトランスフェクションの効率を調べるために、Tat と同時に Renilla Luciferase を発現するベクターを共導入した。また導入する DNA 量は 202 ng/well になるように pME-Flag の空ベクターを用いて補正した。



Table 1: dual-color reporter 作製に用いた primer

Name	Sequence (5' to 3')
AgeI LTR forward	accggttgaaggctaattc
AgeI LTR reverse	accggttgctagagattttccac
NotI Tat forward	gcggccgcatggagccagtaga
BamHI Tat reverse	ggatccctattccttcgggcctgtc
Sall LTR-Tat-IRES-Venus For	gtcgacaggggtcggcaattgaacc
XbaI LTR-Tat-IRES-Venus Rev	tctagaggctcgagaggccttgaat

Table 2: DNA PCR に用いた Primer

Name	Sequence (5' to 3')
Forward primer (LTR)	accggttgaaggctaattc
Reverse primer-1 (mRFP)	ggcgcgctcgtactgttcc
Reverse primer-2 (Venus)	tcagggtcagcttgccttag
gag forward	tgtgagagagcgtcggattaaag
gag reverse	agctccctgcttgcctata
Alb-S-F	cctgaagctcaactccctattgct
Alb-S-R	tggttctaaacttgctccctca

Table 3: RT-PCR にもちいた primer

Name	Sequence (5' to 3')
$\beta$ -actin F	gccgacggccagggtcat
$\beta$ -actin R	caggactccatgccaggaa
EZH2 F	gtaaatccaaactgctatgcaa
EZH2 R	gcaaaaattcactggtacaaaa
SUZ12 F	gtcatgaagcatgggtttattg
SUZ12 R	tgactagatgaagcatgaagtttcg
795 gag F	ggtgagagagcgtcggattaaag
911 gag R	agctccctgcttgcctata
Venus F 53	agctggacggcgacgtaaac
Venus R 136	tcagggtcagcttgccttag

Table 4 : ChIP assay にもちいた primer

Name	Sequence (5' to 3')
MYT-1 dF (ChIP)-5	aggcaccttctgttgccga
MYT-1 dR (ChIP)-5	aggcagctgcctcccgaca
GAPDH prom F	aacttcccgcctctcagc
GAPDH prom R	caggaggacttgggaacga
LTR-ChIP-5 (-102)	gactttccgctggggactt
LTR-ChIP-3 (+9)	agagagaccagtagcagcaaaa
-274 F	aataaaggagagaacaccagc
-121 R	gtcagcagttctgaagtac
+96 F	caaagtagtgtgtgcccgtc
+205 R	cgctgcagaattctcgagac
Nuc-0 F -390	acacacaaggctacttcctga
Nuc-0 R -283	tctaccttatctggctcaactggt
Nuc-1 F +30	ctgggagctctctggctaacta
Nuc-1 R +134	ttaccagagtcacacaacagacg

Table 5 :

shRNA の作製に用いた合成オリゴ DNA 配列（下線部分が siRNA として機能する配列）

Name	Sequence (5' to 3')
shEZH2-A top	GATCC <u>GAAATGGAAACAGCGAAGG</u> ACTGTGAAGCCACAGATGGGT CCTTCGCTGTTCCATTCTTTTTTAT
shEZH2-A bottom	CGATAAAAAAAGAATGGAAACAGCGAAGGACCCATCTGTGGCTTC ACAGTCCTTCGCTGTTCCATTTCG
shEZH2-B top	GATCCAAACAGCTGCCTTAGCTTCACTGTGAAGCCACAGATGGGT GAAGCTAAGGCAGCTGTTTTTTTTTAT
shEZH2-B bottom	CGATAAAAAAAAACAGCTGCCTTAGCTTCACCCATCTGTGGCTTC ACAGTGAAGCTAAGGCAGCTGTTTG
shEZH2-C top	GATCCGCTAGGTTAATTGGGACCAA <u>ACT</u> GTGAAGCCACAGATGGG TTTGGTCCCAATTAACCTAGCTTTTTTAT
shEZH2-C bottom	CGATAAAAAAAGCTAGGTTAATTGGGACCAAACCCATCTGTGGCTTC CACAGTTTGGTCCCAATTAACCTAGCG
shSUZ12-A top	GATCCAAGCTGTTACCAAGCTCCGTGCTGTGAAGCCACAGATGG GCACGGAGCTTGGTAACAGCTTTTTTTAT
shSUZ12-A bottom	CGATAAAAAAAGCTGTTACCAAGCTCCGTGCCCATCTGTGGCTTC ACAGCACGGAGCTTGGTAACAGCTTG
shSUZ12-B top	GATCCGCTGACAATCAAATGAATCATCTGTGAAGCCACAGATGGG ATGATTCATTTGATTGTCAGCTTTTTTAT
shSUZ12-B bottom	CGATAAAAAAAGCTGACAATCAAATGAATCATCCCATCTGTGGCTTC CACAGATGATTCATTTGATTGTCAGCG
shSUZ12-C top	GATCCGCAGGAAATCCTCAGGATACTGTGAAGCCACAGATGGGTA TCCTGAGGATTCCTGCTTTTTTAT
shSUZ12-C bottom	CGATAAAAAAAGCAGGAAATCCTCAGGATACCCATCTGTGGCTTCA CAGTATCCTGAGGATTCCTGCG
shSUZ12-D top	GATCCGGGACAGCAAATGGATT <u>ACT</u> GTGAAGCCACAGATGGGTA AATCCATTTGCTGTCCCTTTTTTAT
shSUZ12-D bottom	CGATAAAAAAAGGGACAGCAAATGGATTTACCCATCTGTGGCTTCA CAGTAAATCCATTTGCTGTCCCG
shScramble top	GATCCACGCTGGGACGTGTGCCTGTTCTGTGAAGCCACAGATGG GAACAGGCACACGTCCAGCGTTTTTTTTAT
shScramble bottom	CGATAAAAAAACGCTGGGACGTGTGCCTGTTCCCATCTGTGGCTTC CACAGAACAGGCACACGTCCAGCGTG

Table6 :

抗体リスト

Name		用途
anti-H3K27me3	Active Motif, #39155	ChIP assay
anti-H3K9me3	Abcam, #ab8898-100	ChIP assay
anti-H3K4me3	Cell Signaling, #9751S	ChIP assay
anti-AcH3	Millipore, #06-599	ChIP assay
normal Rabbit IgG	Cell Signaling, #2729S	ChIP assay
Anti-EZH2	Cell Signaling, #3147S	Western blot
Anti-SUZ12	Cell Signaling, #3737S	Western blot /ChIP assay
Anti- $\beta$ -actin	SantaCruz Biotechnology, sc-8432	Western blot
$\alpha$ -Tubulin(B-7)	Santa cruz biotechnology, inc.:sc-5286	Western blot
Anti-YY1	Santa cruz Biotechnology:sc-7341	Western blot
Anti-mouse IgG (H&L)AP conjugated	Promega	Western blot 2次抗体
Anti-rabbit IgG (Fc)AP conjugated	Promega	Western blot 2次抗体

## 結果

### I. 潜伏化モデル dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の作製と検証

#### 1. 潜伏化モデル dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の作製

潜伏化の成立メカニズムの研究を困難にさせている主な要因として 2 つの問題点が挙げられる。1 点目は、非感染細胞と潜伏感染細胞を識別が困難であること、2 点目は感染者体内での潜伏感染が低頻度でしか成立しないことである。潜伏化のメカニズムを解析するために、これらの問題点を考慮して、感染から慢性感染までの LTR 活性のモニターに特化したレポーターである dual color reporter(LTR-Tat/empty-IRES-Venus-EF-1-mRFP)を作製した。

レポーターは Fig.4 A に図示した。このレポーターは LTR をプロモーターとして Venus を発現し、下流の EF-1 プロモーターから mRFP を発現する。mRFP は感染細胞のトレーサーとして機能するため、Flowcytometry を用いて蛍光の発現を解析すると、感染細胞での LTR の活性を観察することが可能である。また潜伏感染成立の効率を上げるためにウイルス遺伝子のほとんどを欠損させ、レポーター導入による細胞毒性を低下させた。

レポーター作製に用いた LTR 配列は、single-round HIV-1 (NL4-3 EGFP Kp)感染 Molt4 細胞の gDNA を鋳型にクローニングした。Tat は HIV-1 NL4-3 株感染 Molt4 の cDNA を鋳型にクローニングした。理化学研究所の三好浩之先生が開発された CS II -EF-MCS-IRES2-Venus(Miyoshi et al., 1997; Miyoshi et al., 1998) をもとに CS II ベクター内で LTR-Tat/empty-IRES-Venus を構築した。このベクターから LTR-Tat/empty-IRES-Venus 配列を PCR を介して pENTER にサブクローニングした後、Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) によって CS-RfA-EF-mEFP1 ベクターに組み換え、

CS-LTR-Tat/empty-IRES2-Venus-EF-1-mRFP を作製した (詳細は材料と方法を参照)。

## 2. Dual-color-reporter(LTR-Tat/empty-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の一過的発現の解析

まず、dual-color-reporter に搭載した LTR と EF-1 promoter が機能するかを検証するために、dual-color-reporter を一過的に導入した HEK293T 細胞での Venus 及び mRFP の発現を、Flowcytometry を用いて調べた。その結果、Tat 搭載レポーター、Tat 欠損レポーターのいずれでも Venus、mRFP の発現が観察され、両者の発現に比例関係が見られたことから、作製した配列の LTR,EF-1 promoter がそれぞれ良好に機能していることが明らかとなった。また Tat 搭載レポーターで Venus の発現が強かったことから、LTR が Tat に応答することが示された (Fig.4 B)。

## 3. Dual color reporter(LTR-Tat/empty-IRES-Venus-ef-1-mRFP)stable 導入細胞での発現の解析

続いて、Tat 搭載レポーターと Tat 欠損レポーターをレンチウイルスベクターシステムを用いて、Jurkat 細胞に安定的に導入し、ゲノムに挿入された場合のレポータータンパク質の発現を解析した。Tat 搭載及び Tat 欠損 dual-color reporter の各レンチウイルスベクターを感染させ、72 時間後に Flowcytometry 解析を行い、前方散乱光 (FSC)、側方散乱光 (SSC) の展開で intact なパターンを示した細胞にゲートをかけた後、Venus、mRFP の展開で少なくともどちらかの蛍光の発現を確認できた細胞集団をレポーター感染細胞とみなした。このレポーター感染細胞での Venus の発現強度を解析したところ、Tat 搭載株導入 Jurkat 細胞では 0 から 10 の 3 乗までの幅をもった Venus の発現が観察された。一方、Tat 欠損レポーター導入 Jurkat では Venus の発現が見られなかった (Fig.4 C)。この結果から、このレポーターを用いて感染細胞中の LTR の活性の分

布を観察することが可能であること、LTR の活性がない感染細胞を識別できることが確認された。

#### 4. レポーター導入 Jurkat 細胞での LTR 活性の経時的変化の解析

作製したレポーターが HIV の潜伏化を観察するためにモデルになりうるか検証するために Tat 搭載及び欠損 dual-color reporter を導入した Jurkat 細胞を長期培養し、集団での LTR 活性の変化を観察した。各レポーター導入 Jurkat 細胞集団での Venus の蛍光強度の平均(MFI)と Venus 陽性細胞の割合を Flowcytometry を用いて解析した結果、Tat 搭載レポーターでは導入後 3 日目に LTR 活性のピークを示し、感染後約 40 日をかけて集団全体の LTR の活性が減少した。MFI の変化と Venus 陽性細胞の割合の変化のパターンを比較したところ、LTR の活性は 4 日目から 7 日目にかけて急激に落ち、その後 Venus 陰性になることがわかった。一方 Tat 欠損レポーターの導入では LTR の活性は導入直後から低く、長期培養を経ても変化しなかった(Fig.5 A)。

Tat 搭載株導入 Jurkat 細胞を長期培養し、Venus の発現が落ち着いた後の細胞集団に再活性化可能な LTR 配列が存在しているか検証するために、長期培養後のレポーター感染細胞集団に既に報告されている HIV-1 の再活性化刺激を行った。再活性化刺激としては NF- $\kappa$ B 経路を活性化させる刺激である TNF- $\alpha$ 処理、TCR signal 経路を活性化させるための PMA/Ionomycin 共処理を行った。その結果、集団全体での LTR の活性が TNF- $\alpha$ 処理では 5 倍、PMA/Ionomycin では 10 倍まで再活性化された(Fig.5 D)。この結果から、長期培養したレポーター導入細胞集団の中に再活性化可能なレポーターのプロウイルスが存在することが示唆された。また HIV の転写抑制には HDAC が関わることが報告されている。そこで、レポーター導入系での抑制メカニズムにも HDAC が関与するか検証するために、HDAC 阻害剤であるバルプロ酸(VPA)を処理した。その結果、長期培養後の集団に VPA の濃度依存的に LTR が再活性化された(Fig.5 E)。

LTR のプロモーター活性の抑制の特異性を検証するために、同時に導入した EF-1 promoter の活性の経時変化を観察した。その結果、EF-1 promoter から発現する mRFP の MFI は長期培養を経ても一定であった(Fig.5 B)。この結果から、導入したレポーター配列の中でも、LTR が特異的に抑制を受けていることが示唆された。

また LTR のプロモーター活性抑制への下流の EF-1 promoter の影響を検証するために、下流の EF-1-mRFP の配列を欠損させた single-color-reporter(LTR-Tat-IRES-Venus)を作製し(Fig.6 A)、LTR の活性の変化を調べた。その結果、この single-color-reporter 導入 Jurkat 細胞集団でも長期培養によって LTR の活性が減少した(Fig.6 B)。Single-color reporter を導入して長期培養後の細胞集団に再活性化可能な感染細胞が存在するか検証するために、TNF- $\alpha$ 、PM/Ionomycin、VPA 処理による再活性化実験を行った。その結果、これらの処理によって LTR 活性が再活性化された。この結果から single-color reporter の系においても転写レベルで LTR 活性が抑制されたレポーター導入細胞集団が存在することが示唆された。この結果から LTR 抑制が下流のプロモーターの影響ではないことが示唆された(Fig.6 C)。

以上の結果から Tat 搭載レポーター導入系(dual-color-reporter)では①導入後の LTR プロモーター活性の抑制の過程が定性的かつ定量的に観察できること、②抑制されたレポーター導入細胞集団の LTR は再活性化可能であり、その抑制メカニズムには HDAC が関与することが明らかとなった。この結果から作製した Tat 搭載レポーター導入系が潜伏化成立を観察するためのモデルとなりうると考えられた。

## II. レポーター導入系を用いた潜伏化成立メカニズムの解析

### 1. 感染初期の LTR のプロモーター活性の解析

I で作製・検証したレポーターを用いて、感染初期の LTR の活性を解析した。その



結果、感染 3 日目のレポーター導入細胞中に Venus の活性の強い集団と弱い集団がいることが明らかとなった。この現象は T 細胞株である Jurkat 細胞、CCRF-CEM 細胞、SupT1 細胞、上皮系細胞である HEK293FT 細胞でも観察された。この結果から、感染初期に LTR の活性が 2 つのピークを示すという現象は細胞の種類に依存しない普遍的な現象であることが明らかになった(Fig.7 A)。

またこの現象は single-color-reporter を Jurkat 細胞に導入した場合にも観察された(Fig.7 B)。この現象が primary の細胞でも見られるか検証するために、single-color-reporter を活性化 PBMC に導入した。CD4 陽性細胞を APC-conjugated CD4 抗体で免疫染色したのち、Flowcytometry 解析した結果、primary の細胞においても感染直後の LTR の活性が強い集団と弱い集団が存在することが明らかとなった(Fig.7 C)。

## 2. 感染直後に LTR が抑制された集団の解析

1. で観察された感染初期に LTR 活性が抑制された集団での LTR 抑制メカニズムを解析するために、感染 4 日目にレポーター導入細胞を LTR の活性の強度によって Venus(+), Venus(-)の 2 つの集団に定義し、FACS Aria cell sorter を用いて分取した(Fig.8 A)。

分取した Venus(-)集団について、レポーター配列の欠損の可能性を検証するために、gDNA を抽出し、レポーター配列の確認を PCR を用いて行った。レポーター配列の全長である LTR から mRFP の配列を増幅するための primer set を用いた PCR の結果、Venus(-)と Venus(+ )の集団では同じサイズの増幅産物が得られた。また LTR から Venus の配列を増幅した場合にも二つの集団で同じサイズの増幅産物が得られた(Fig.8 B)。これらの結果から、Venus(-)集団での Venus の発現の欠失はレポーター配列の大きな欠損や、Venus 配列の欠損によるものではないことが示唆された。Venus(-)集団で

のレポーターRNA の発現を RT-PCR を用いて調べた結果、Venus(+)と比較して約 10 分の 1 程度であった(Fig.8 C)。これらの結果から Venus(-)集団では、レポーター配列の欠損ではなく、RNA での発現が低いことが明らかとなった。

続いて、Venus(-)の集団に存在する LTR 配列が再活性化可能であるか検証するために、TNF- $\alpha$ 処理、PMA/Ionomycin 処理を行った(Fig.8 D)。その結果、これらの処理により LTR の活性化が誘導され、Venus(-)の集団で LTR の抑制は転写レベルであることが示唆された。

### 3. 感染直後の LTR 抑制に関わるエピジェネティック制御の解析

Venus(-)集団でレポーターの発現が転写レベルで抑制されていることが示唆されたことから、LTR 周辺のエピジェネティックな制御に注目した。Venus(-)集団と Venus(+)集団間の LTR 上のエピジェネティック制御の違いを明らかにするために、まず DNA のメチル化修飾を解析した。Bisulfate sequence 法によって Venus(-)集団と Venus(+)集団の LTR 周辺の DNA のメチル化のレベルの違いを解析した結果、どちらの集団でも LTR 周辺の CpG site にメチル化修飾は存在しなかった (data not shown)。

続いて、転写制御に関わるヒストン修飾に注目した。転写活性化と抑制に関わるヒストン修飾についてクロマチン免疫沈降法(ChIP)を用いて解析し、Venus(-)及び Venus(+)集団間で比較した。転写活性化に関わる修飾としてヒストンアセチル化修飾(AcH3)、ヒストン H3 Lysine4 トリメチル化修飾(H3K4me3)、転写抑制に関わる修飾としてヒストン H3 Lysine27 トリメチル化修飾(H3K27me3)、ヒストン H3 Lysine9 トリメチル化修飾のレベルを調べた。ChIP assay の検出は LTR 上の promoter 領域とその前後に設計した 3 種類の primer set を用いて行った(Fig.9 A)。その結果、Venus(-)の集団では転写活性化に関わる AcH3 レベルはプロモーター領域・転写開始点周辺において低い傾向、H3K4me3 はプロモーター領域・転写開始点とコード領域において低い

傾向が見られた。一方、抑制マーカ―に関しては、H3K27me3 レベルがプロモーター領域・転写開始点で顕著に蓄積していることが明らかとなった。また H3K9me3 はどちらの集団でも蓄積が見られなかった。この結果から Venus(-), Venus(+ )集団間には LTR のエピジェネティック制御に違いがあり、さらに Venus(-)の集団で LTR 上に蓄積している修飾は H3K27me3 レベルであることがわかった。そこで、H3K27me3 レベルを制御することが報告されている Polycomb repressive complex 2 (PRC2)に注目し、PRC2の主要な構成因子である EZH2,SUZ12が Venus(-)集団の LTR 上に蓄積しているか、検証した。EZH2,SUZ12 それぞれの抗体を用いて ChIP assay を行い、LTR promoter 領域上への局在のレベルを Venus(-),Venus(+ )集団間で比較したところ、Venus(-)集団では Venus(+ )集団よりも SUZ12 が多く局在していることが明らかになった(Fig.9 C)。EZH2 の局在レベルはどちらの集団でも negative control のレベルと同等であった(data not shown)。

Venus(-)集団での LTR 抑制への PRC2 の影響を解析するために、PRC2 の特異的阻害剤である DZNep 処理による LTR の再活性化を検討した。レポーター導入後 20 日目の Venus(-)集団に DZNep を 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M で 48 時間処理し、LTR の活性を解析したところ、DZNep の濃度依存的に LTR の活性が増加した。また既に HIV-1 LTR を再活性化することが報告されている HDAC 阻害剤 VPA 及び SAHA の処理によっても LTR の活性が再活性化された。さらに、DZNep と VPA または SAHA の共処理によって、単独処理の場合よりも強く LTR が活性化された(Fig.10 A)。これら結果から、Venus(-)の集団で PRC2 による H3K27me3 修飾によって LTR の活性が抑制されていること、PRC2 と HDAC が協調して LTR の抑制に寄与していることが明らかとなった。

#### 4. 宿主エピジェネティック制御因子 Polycomb repressive complex 2(PRC2)の感染初期の LTR 活性への影響の解析

感染初期の急激な LTR 抑制への PRC2 の影響を解析するために、PRC2 ノックダウン細胞にレポーターを導入し、感染初期の LTR の活性の変化を調べた。

PRC2 のノックダウンは PRC2 の主要な構成因子である EZH2,SUZ12 に特異的な shRNA を設計し、Jurkat 細胞にレトロウイルスベクターを用いて導入することにより行った。shRNA 発現配列と同時に導入した G418 耐性遺伝子によって、導入細胞の選択を 2 週間行い、shRNA 発現細胞株を樹立した。3 種類の shEZH2、4 種類の shSUZ12 それぞれの発現細胞から lysate を採取し、ノックダウンの効率をタンパク質レベルで比較した。その結果、shEZH2 では配列 A、B、shSUZ12 では配列 A、B で最も高いノックダウン効率が得られた。今後の実験では shEZH2-A、shSUZ12-A を用いて行った(Fig.11 A)。

樹立した EZH2, SUZ12 ノックダウン細胞株のレポーターを導入し、感染初期の Venus(-),Venus(+)の集団の割合と、その後の LTR 活性の変化を解析した。実験のスケジュールは Fig.11 B に示した。EZH2, SUZ12 ノックダウン細胞株で感染初期の Venus(-)及び Venus(+)の集団の割合を調べた結果、EZH2, SUZ12 ノックダウン細胞株で Venus(+)の細胞の割合がわずかに増加した。割合の差は感染 6 日目に最大になり、コントロール細胞では Venus(+)集団が感染細胞中の 50%であったのに対し、SUZ12 ノックダウン、EZH2 ノックダウン細胞では約 60%であった。また Venus の MFI から導入細胞全体の LTR の活性の変化を導入後 14 日まで観察したところ、EZH2 ノックダウン、SUZ12 ノックダウン細胞では、active な LTR の活性が抑制を受け始める 6 日目以降もコントロールと比較して導入細胞全体の LTR の活性が高いことが明らかとなった。この結果から PRC2 が感染直後の LTR の抑制に関わることで感染後の Venus(-)と Venus(+)の集団の割合の決定に寄与していることが示唆された(Fig.11 C, D)。

## 5. PRC2 knockdown の細胞への影響の解析

PRC2 は H3K27me3 修飾を介して多くの遺伝子発現制御に関わり、様々な生命現象に関与している。このことから PRC2 の主要構成因子のノックダウンによって下流の多くの遺伝子の発現が変動することが予想される。PRC2 ノックダウンによって間接的に LTR の活性化が起こっている可能性を検証するために、LTR のプロモーター活性を最も強力に活性化する転写因子である NF- $\kappa$ B 経路の活性が PRC2 ノックダウンによって変動するか検証した。6 x  $\kappa$ B luciferase reporter を用いて、樹立した EZH2,SUZ12 ノックダウン Molt4 細胞内での NF- $\kappa$ B 経路をレポーターアッセイにより解析した。6x $\kappa$ B luiferase reporter を導入した Molt4 細胞に Positive control として TNF- $\alpha$ 処理を 16 時間した結果、Luc の活性が約 4 倍に増加した。この系を用いて、EZH2、SUZ12 ノックダウンの NF- $\kappa$ B 経路に与える影響を検討したところ、SUZ12,EZH2 ノックダウンした細胞とコントロール細胞では NF- $\kappa$ B 経路の活性に有意な違いは見られなかった (Fig.12 A)。この結果から、EZH2、SUZ12 ノックダウン細胞で NF- $\kappa$ B 経路が活性化し、LTR が活性化されている可能性が否定された。

また PRC2 は細胞周期に関わる遺伝子群の発現制御に関わること報告されていることから、EZH2、SUZ12 ノックダウンによる細胞増殖への影響を検討した。その結果、G418 選択開始後 19 日目での細胞増殖アッセイでは Molt4 細胞と比較してノックダウン細胞では増殖能が低下していることが明らかとなった (Fig.12 B 上段)。しかし G418 選択後 26 日目に開始した細胞増殖アッセイではノックダウン細胞株はコントロール細胞と同等の増殖能を示した (Fig.12 B 下段)。またノックダウン細胞の 19 日目と 26 日目の増殖能の比較では、26 日目において増殖能が増加していることが明らかとなった。EZH2、SUZ12 のノックダウンによる細胞増殖への影響が LTR 活性に与える影響は不明であるが、ノックダウン細胞株樹立後のタイミングによって細胞増殖能が異なることが明らかとなった。この結果から PRC2 ノックダウン後、培養を続けると PRC2 に非依存的に増殖する細胞群が選択的に増えてくることが考えられた。今後の PRC2 のノ

ックダウン実験では薬剤選択開始後 2 週間以内の細胞を解析に用いることとした。

## 6. Single-round HIV 感染系を用いた潜伏化モデルの作製

Dual-color-reporter 導入系を用いて得られた結果を、より野生型 HIV に近い材料を用いて検証するために、single-round HIV 感染系を用いた潜伏化モデルを作製した。

Single-round HIV は徳島大学足立昭夫教授より開発された pNLnGFP-Kp を用いた (Fukumori et al., 2000)。このウイルスは *env* に欠損があり、自己複製できない single-round 感染系である。また *nef* に EGFP が挿入されており、ウイルス遺伝子の発現を EGFP の発現として検出することが可能である (Fig.13 A)。この single-round HIV を VSV-G で pseudotype し、Molt4 細胞に感染させた。

Single-round HIV 感染 Molt4 細胞でのウイルス遺伝子の発現を観察したところ、感染後 3 日目をピークに減少していくことが明らかとなった (Fig.13 B)。Single-round HIV 感染 Molt4 細胞の生存率を Flowcytometry 解析の FSC,SSC の展開から簡易的に解析したところ、感染細胞のほとんどがウイルス遺伝子の細胞毒性によって死滅していることが明らかとなった (Fig.13 C)。感染 7 日目のウイルス遺伝子の発現が落ち着いた後の感染細胞集団に再活性化可能なプロウイルスをもつ感染細胞が存在するか検証する目的で、Single-round HIV 感染 Molt4 細胞集団に TNF- $\alpha$  または HDAC 阻害剤である TSA をそれぞれ 16 時間処理し、EGFP の発現を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、TNF- $\alpha$ 、TSA 処理によって EGFP 発現細胞の増加が観察された。また顕微鏡観察から EGFP 発現細胞では細胞がやや大きく破裂していることが観察され、この細胞でウイルス遺伝子が発現し細胞傷害効果が表れていると考えられた。ウイルス遺伝子の発現が再活性化した細胞の割合を Flowcytometry 解析により定量したところ、再活性化前は EGFP 陽性細胞の割合が 10% 程度であったのに対し、TNF- $\alpha$  処理によって 30%、TSA 処理によって 40% まで増加したことが明らかとなり、single-round HIV 感染系で潜伏

感染が成立していることが示唆された。

この潜伏化モデルでの LTR の抑制に PRC2 が関与しているか検証するために、DZNep 処理を行い、LTR の活性を解析した。DZNep はメチル基の供与体である S-adenosyl-methione の類似体であり、PRC2 に取り込まれ、メチルトランスフェラーゼ活性を阻害するとともに、PRC2 自体の安定性を低下させ、構成因子のタンパク質レベルでの発現量を減少させることが報告されている。そこで Molt4 細胞に DZNep を 1,5,10 $\mu$ M の濃度で 24 時間処理し、EZH2,SUZ12 のタンパク質レベルの発現量の変化から DZNep の効果を検討した。その結果、1 $\mu$ M、24 時間でも SUZ12 のタンパク質レベルでの減少が観察され、各濃度で PRC2 の機能阻害が起こっていることが示唆された(Fig.14 A)。single-round HIV 感染後 14 日目の潜伏感染 Molt4 細胞に DZNep を処理し、処理後 24 時間から 72 時間までのウイルス遺伝子の発現レベルの変化を EGFP の発現量の変化から解析した。その結果、DZNep 処理時間依存的にウイルス遺伝子の発現が増加することが明らかとなった(Fig.14 B)。DZNep の濃度依存的な効果について検討したところ、1 $\mu$ M と 5 $\mu$ M の比較では処理後 72 時間でのウイルス遺伝子の発現レベルに濃度の影響が見られた。5 $\mu$ M と 10 $\mu$ M ではウイルス遺伝子の活性化のレベルに濃度依存性は見られなかった。これは潜伏化モデル中に存在する再活性化可能なプロウイルスが 5 $\mu$ M で全て再活性化され、これ以上の再活性化が起こらなかったためではないかと考えている。

また DZNep による再活性化の効果を他の再活性化刺激と比較し、DZNep 処理の影響のを検討した。Single-round HIV 感染 14 日目の Molt4 細胞に TNF- $\alpha$ (10ng/ml)16 時間処理、TSA(500nM)16 時間処理、DZNep(5 $\mu$ M)72 時間処理の影響をヒストグラムにし比較した。その結果、DZNep 処理では EGFP 陽性細胞の割合が 15.54%であり、

TSA 処理による HDAC 阻害と同等の影響であることが明らかとなった(Fig.14 C)。

## 7. PRC2 の感染初期のウイルス遺伝子発現への影響の解析

Single-round HIV 潜伏感染モデルを用いて、感染初期のウイルス遺伝子発現への PRC2 の影響を検討した。まず、この潜伏化モデルにおいて感染初期の急激な LTR 活性の抑制が起きているか検証する目的で、CCRF-CEM 細胞に single-round HIV を感染させ、感染 2 日目に PMA/Ionomycin 処理を行い、処理後 24 時間でのウイルス遺伝子発現細胞の割合の変化を調べた。その結果、PMA/Ionomycin 処理により EGFP 陽性細胞の割合は 51.80%となった。通常の培養では感染 3 日目の EGFP 陽性細胞の割合は約 10%であったことから、差の 41%が再活性化可能なプロウイルスをもった感染細胞であったことが示唆され、この single-round HIV 感染系においても感染初期の急激な LTR の抑制が起きていることが明らかとなった(Fig.15 A, B)。

Single-round HIV 感染系を用いて感染初期のウイルス遺伝子発現への PRC2 の影響を解析するために、EZH2、SUZ12 をノックダウンした Molt4 細胞に、single-round HIV を感染させ、感染初期のウイルス遺伝子発現細胞の割合を比較した。その結果、SUZ12 ノックダウン、EZH2 ノックダウンによって感染 3 日目の EGFP 陽性細胞の割合が増加した(Fig.15 C)。感染 2 日目の細胞から抽出した DNA を用いた *gag* 遺伝子の PCR の結果から、single-round HIV の感染効率には細胞株間に顕著な違いは観察されなかった(Fig.15 D)。この結果から PRC2 が感染初期のウイルス遺伝子の発現量に影響し、感染初期の成立する潜伏化に寄与することが示唆された。

この結果をさらに検証するために、DZNep を 48 時間前処理した Jurkat 細胞に single-round HIV を感染させ、感染初期のウイルス遺伝子発現への PRC2 の影響を解析した。その結果、前処理した DZNep の濃度依存的に感染 3 日目の EGFP 陽性細胞の割合が増加する傾向が見られ、この結果からも感染細胞での PRC2 の活性が感染初期のウイルス遺伝子の発現に影響することが明らかとなった(Fig.15 F, G)。



## 8. 活性化された LTR の経時的な抑制過程におけるエピジェネティックの変化

続いて、dual-color-reporter 導入系で感染初期に分取した Venus(+)集団に注目した。この細胞集団を長期培養し、LTR の活性の経時変化を観察したところ、導入 20 日目から 70 日目までに徐々に活性が抑制され、一定の値で定常状態になることが明らかとなった(Fig.16 A)。この経時的な LTR の抑制の間に LTR 上に起きたエピジェネティックな変化について解析を行うために、レポーター導入 12 日目と 120 日目の集団の LTR 上の転写抑制的なヒストン修飾のレベルを ChIP assay によって解析した。Venus(+) 集団の導入 12 日目と 120 日目の比較では、どちらの修飾も 12 日目には蓄積していなかったが、H3K27me3、H3K9me3 レベルはそれぞれ control IgG の 2 倍に増加していた(Fig.16 B)。この結果から LTR 上の抑制的なヒストン修飾の蓄積が活性化 LTR の経時的な抑制に寄与している可能性が考えられた。

## 9. 経時的な LTR 活性の抑制における PRC2、HDAC の役割の解析

LTR の経時的な抑制が宿主のエピジェネティック制御因子の影響を受けているか検証するために、分取した Venus(+)集団を低濃度のエピジェネティック阻害剤存在下で培養し、Venus(+)の細胞の割合の変化を調べた。まず PRC2 による LTR 抑制効果を検証するために、レポーター導入 13 日目の Venus(+)集団を DZNep100nM, 500nM 存在下で培養した。その結果、DMSO 処理を行った集団では徐々に Venus(+)の集団が減少したのに対し、DZNep を処理した細胞では、DZNep の濃度依存的に Venus(+)の集団の割合が高い状態で保たれた(Fig.17A)。またより PRC2 に対して特異的な次世代の PRC2 阻害剤である GSK126 についても LTR 抑制を阻害するか検討したところ、DZNep と同様に濃度依存的に LTR の抑制を阻害することが明らかとなった(Fig.17 B)。

次に DZNep と SAHA の共処理による LTR 抑制の阻害効果を検討したところ、長期培養はできなかったが、共処理によって DZNep, SAHA の単独処理よりも Venus(+)の

集団の割合が高く保たれた (Fig.17 C)。GSK126 についても同様の傾向が得られた (Fig.17 D)。この結果から、PRC2 が活性化している LTR の経時的な抑制に寄与すること、PRC2 と HDAC は協調的に LTR の抑制に働くことが示唆された。

### III. 成立メカニズムの異なる潜伏感染細胞集団の違いについて

#### 1. LTR 上のエピジェネティックス制御の違いの解析

Venus(-)集団でも導入 12 日目と 120 日目の比較を行ったところ、抑制的なヒストン修飾の蓄積のレベルの増加が見られた。120 日目での抑制的なヒストン修飾の蓄積の程度を Venus(-), Venus(+ )集団で比較した結果、Venus(-)集団では H3K27me3 レベルは約 2.5 倍、H3K9me3 レベルは 2 倍高いことが明らかとなった。この結果から抑制的なヒストン修飾の程度は感染初期の LTR の活性によって異なり、感染直後から LTR の活性が抑制された集団において高いことが明らかとなった (Fig.16 B)。

#### 2. LTR 活性化刺激・エピジェネティック制御因子阻害剤への応答性の違い

ここまでの解析から LTR の活性が抑制された後も感染初期に Venus(-)と Venus(+ )で分けた集団間には LTR 上のヒストン修飾のレベルに違いがあることが明らかとなった。そこで、この成立メカニズムの異なる 2 つの潜伏感染細胞集団の性質の違いについて解析した。

まず、LTR を活性化する刺激に対する応答性を比較した。TNF- $\alpha$ 処理による NF- $\kappa$ B の活性化、PMA/Ionomycin 処理による TCR signal の活性化を誘導した結果、どちらの集団でも LTR の活性を誘導することが出来た。また LTR の活性のレベルは、Venus(+ )集団の方が高いことが明らかとなった (Fig.18 A)。この結果から 2 つの集団では抑制のメカニズムが異なる可能性が想定された。そこで続いてエピジェネティック制御因子の阻害剤への LTR の感受性を 2 つの集団間で比較した。その結果、エピジェネティック

制御因子阻害剤に対しても Venus(+)集団が高い LTR 活性を示した(Fig.18 B)。この結果から、dual-color-reporter を用いて感染初期に分取した Venus(-)と Venus(+)集団では LTR の活性が抑制された後でも異なる性質をもった潜伏感染細胞集団を形成することが考えられた。この結果から Venus(-)の集団にはより強固な抑制メカニズムが存在する可能性が示唆された。

#### IV. 潜伏感染モデル HeLa/LTR-luciferase を用いた Tat の LTR 活性化能への PRC2 の影響の解析

##### 1. HeLa/LTR-luciferase 細胞での PRC2 の LTR 抑制能の解析

潜伏化モデルである HeLa/LTR-Luciferase 細胞を用いて、LTR のプロモーター活性に対する PRC2 の影響と Tat による LTR 活性化能への影響を調べた。潜伏化モデル HeLa/LTR-Luciferase 細胞は、LTR をプロモーターとして Luciferase を発現するコンストラクトをトランスフェクションによって導入し、安定的に発現する細胞を株化したモデルである。この系を用いて、LTR のプロモーター活性を luciferase の活性として評価した。HeLa 細胞は上皮系の細胞株であるため、高いトランスフェクション効率が得られ、注目する因子を過剰発現させた影響の解析に向いている。

HeLa/LTR-Luciferase 細胞においてレトロウイルスベクターを用いて EZH2、SUZ12 をノックダウンし、レポーターアッセイによって LTR のプロモーター活性に対する PRC2 の機能を検討した。その結果、EZH2、SUZ12 ノックダウン細胞では、コントロール細胞に比べて LTR の活性レベルが約 2 倍に増加していた(Fig.19 A,B)。この結果から HeLa/LTR-luciferase の系においても PRC2 が LTR の抑制に寄与していることが明らかとなった。

本研究で用いた HeLa/LTR-luciferase は LTR-Luciferase 搭載プラスミドと薬剤耐性遺伝子を搭載したプラスミドを HeLa 細胞に co-transfection し、薬剤選抜によって選択し樹立

した細胞である。本方法を用いることで LTR 配列自体に転写抑制をうける配列を搭載していることが示唆された。またトランスフェクション等の実験が容易であるため、Tat の有無と LTR 制御の関係を明確にすることができた(Fig. 19 C)。一方でこの方法で得られる形質転換細胞はインテグラーゼ非依存的に宿主ゲノムに挿入されており、インテグレーションサイトの指向性などがインテグラーゼ依存的に挿入されたプロウイルスとは異なる可能性があることが考えられる。従って LTR の転写制御は LTR-Luciferase によって得られたデータに加え、先に用いたインテグラーゼ依存的なレポーターウイルス及び single-round HIV-1 によって得られたデータから総合的に結論付ける必要がある。

## 2. PRC2 の Tat の LTR 活性化能への影響の解析

次に Tat の LTR 活性化能に対する PRC2 の影響を解析するために、SUZ12 をノックダウンした HeLa/LTR-Luc 細胞に 0、1、5、10、20 ng/well の Tat 発現プラスミドベクターをトランスフェクションし、24 時間後に Luc の活性を測定した。その結果、コントロール細胞及び SUZ12 ノックダウン細胞において、Tat の濃度依存的に LTR の活性が増加した。それぞれの細胞における、導入した Tat による LTR の活性化率を調べてみたところ、SUZ12 の減少によって Tat による LTR の転写活性がより増強されることが明らかとなった(Fig.19 C)。

Tat の LTR 活性化能に対する SUZ12 を過剰発現の影響を解析した。Flag-SUZ12 をトランスフェクションした HeLa/LTR-Luc 細胞に Tat をトランスフェクションし、LTR 活性化能を解析した結果、SUZ12 を過剰発現させた細胞では LTR の活性が抑制されることが明らかとなった(Fig.19 D)。この結果から、PRC2 は Tat による LTR 活性化能を阻害することが示唆された。

次に PRC2 ノックダウンの NF- $\kappa$ B 経路への応答性への影響を調べた。SUZ12 をノックダウンした HeLa/LTR-Luc 細胞に TNF- $\alpha$ を 0、5、50 ng/ml の濃度で培地に添加

し、処理後 12 時間後における Luc の活性を測定した。その結果、TNF- $\alpha$  の濃度依存的に LTR の活性化が見られたが、SUZ12 ノックダウン細胞とコントロール細胞での TNF- $\alpha$  処理による活性化率には大きな変化は見られなかった (Fig. 19 E)。

## V. 慢性感染細胞 U1 での PRC2 の LTR 抑制への影響の解析

### 1. U1 細胞でのウイルス発現レベルと LTR 上の H3K27me3 レベルの関係

HIV 慢性感染細胞株である U1 を用いて、LTR 上の H3K27me3 レベルとウイルス RNA の発現レベルの関係を調べた。HIV 慢性感染細胞 U1 は promonocyte であり、実際に潜伏感染細胞として想定している T 細胞ではない。しかし、ここまでの検証から、PRC2 による LTR プロモーター活性のメカニズムが細胞の種類に依存せずに起こる普遍的な抑制メカニズムであることが示唆されたことから、U1 細胞を利用した。また T 細胞由来の HIV 慢性感染細胞である ACH2 細胞でも LTR 上の H3K27 のメチル化修飾が存在することは確認している。ACH2 細胞では EZH2、SUZ12 のノックダウン実験は行っていないが、PRC2 の阻害剤である DZNep 処理によってウイルス RNA の発現が増加すること、転写活性化を誘導した場合には LTR 上の H3K27me3 レベルが低下することを確認している (data not shown)。

U1 細胞に TNF- $\alpha$  を処理し、NF- $\kappa$ B 経路を活性化させたところ、ウイルス RNA の発現は約 100 倍に増加した (Fig. 20 A)。このとき、LTR 上の H3K27me3 レベルは刺激前と比較して、40%程度まで減少した (Fig. 20 B)。この結果から U1 細胞ではウイルス RNA の発現が転写レベルで抑制されていること、ウイルス RNA 発現のレベルと H3K27me3 レベルには逆相関の関係があることが示唆された。

### 2. HDAC 阻害剤によるウイルス発現の誘導時の LTR 上の H3K27me3 レベルの変化

続いて、U1 細胞でのウイルス RNA 発現抑制に宿主のエピジェネティック制御が関

与しているか検証するために、U1 細胞に HDAC 阻害剤 TSA 処理を行った。その結果、TSA500nM 15 時間処理によって、ウイルス RNA の発現は 250 倍に増加した(Fig.20 C)。このとき LTR 上の H3K27me3 レベルはコントロールと比較して 80%程度まで低下した(Fig.20 D)。この結果から、U1 細胞でのウイルス RNA 発現抑制に HDAC が関与すること、HDAC の阻害によるウイルス RNA 発現誘導によって LTR 上の H3K27me3 レベルが変動するあることが明らかになった。

### 3. U1 における PRC2 の LTR 抑制について

U1 細胞でのウイルス RNA 発現抑制への PRC2 の影響を解析するために、EZH2,SUZ12 のノックダウンを行った。まず EZH2,SUZ12 をノックダウンした細胞を樹立し、ウイルス RNA の発現レベルの変化と LTR 上の H3K27me3 レベルについて検討を行った。

EZH2、SUZ12 ノックダウンによる PRC2 の機能阻害を確認するために、Positive control としては MYT-1 プロモーター、Negative control としては GAPDH プロモーター領域を選び、H3K27me3 レベルを ChIP assay によって調べた。その結果、MYT-1 promoter 領域についてはSUZ12 ノックダウンによってH3K27me3 レベルがコントロールと比較して減少したことが明らかになり、PRC2 の機能阻害を確認することができた。また GAPDH promoter 領域ではもともと H3K27me3 のレベルが低く、EZH2,SUZ12 ノックダウンによる H3K27me3 レベルの変化は見られなかった(Fig.21 B)。この EZH2 または SUZ12 ノックダウン U1 細胞で LTR 上の H3K27me3 のレベルを解析したところ、コントロールと比較して現象が見られた(Fig.21 C)。さらに SUZ12 ノックダウン U1 細胞ではウイルス RNA の発現レベルが約 2 倍に増加することが明らかとなり、これらの結果から U1 細胞においても PRC2 が LTR の抑制に働き、ウイルス RNA 発現を抑制していることが明らかとなった。

#### 4. LTR 上での PRC2 の他のヒストン修飾への影響の解析

PRC2 の LTR 上での他のヒストン修飾への影響を解析するために、EZH2,SUZ12 ノックダウン細胞で H3K9me3, AcH3, H3K4me3 レベルの変化を ChIP assay により解析した。PRC2 因子のノックダウンにより promoter 領域だけでなく、その前後の H3K27me3 レベルが減少した。

まず転写抑制的なヒストン修飾はお互いに機能を補うリダンダンシーがあるか検証するために、PRC2 ノックダウン細胞での LTR 上の H3K9me3 レベルの変化を調べたが、H3K9me3 レベルには変化が見られなかった。この結果から抑制的なヒストン修飾のレベルの制御は独立であることが示唆された。また転写活性に関わるヒストンのアセチル化修飾や H3K4me3 修飾は PRC2 による制御と拮抗すると考えられたことから、PRC2 のノックダウンによって変化するか検証した。その結果、PRC2 のノックダウンによって AcH3 のレベルは promoter では変化せず、promoter の前後の領域でわずかに減少した。この結果から PRC2 はヒストンのアセチル化修飾の制御には影響を与えないと考えられた。一方 H3K4me3 レベルは、SUZ12 ノックダウン細胞でのみ H3K4me3 の増加が見られた。この結果から PRC2 の主要構成因子間に H3K4me3 レベルの制御に対する機能の違いがあることが考えられた(Fig.21 C)。

#### VI. PRC2 の LTR 局在メカニズムの解析

##### 1. U1 細胞における YY1 ノックダウンの影響の解析

PRC2 の標的は広範にわたることから、PRC2 の標的特異性を決めているのは PRC2 のリクルーターであると考えられる。そこで、LTR に対する PRC2 のリクルートのメカニズムに注目した。YY1 はショウジョウバエの Preiohomeotic のホモログであり、ショウジョウバエで報告されている PRC2 のリクルーターの中で、唯一脊椎動物に保

存されているものである。また YY1 は PRC2 の EED や PRC1 の BMI1 と相互作用することが報告されている。また、YY1 は以前の報告で HIV-1 LTR に対して抑制的に働くことが報告されている。PRC2 のリクルーターの候補として YY1 を選び、ノックダウンによってウイルス RNA の発現や、LTR のプロモーター活性に影響を与えるか調べた。U1 細胞に YY1 に対する shRNA を発現するレトロウイルスを感染させ、YY1 を恒常的にノックダウンする U1 細胞を樹立したのち、RT-PCR と Western blotting によって YY1 のノックダウンを確認した (Fig. 22 A, B)。この細胞を用いて、YY1 ノックダウンによる LTR 上の H3K27me3 レベルの変化を ChIP assay によって調べたところ、LTR 上の H3K27me3 レベルの減少は見られなかった (Fig. 22 C)。また、RT-PCR によってウイルス RNA 発現レベルの変化を調べたところ、2 回のアッセイで一定の傾向は見られなかった (Fig. 22 D)。以上の結果から、YY1 は LTR においては PRC2 のリクルートメントに関与していないことが示唆された。また HeLa/LTR-luciferase の系においても YY1 ノックダウンを行ったところ、LTR の活性化は観察されなかった (Fig. 22 E)。



## 考察

### 1. 潜伏化成立モデル dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の利点と欠点

結果の項で述べたように、HIV-1 潜伏化成立のメカニズムを研究する上で大きな障害となるのは、ウイルス遺伝子を検出できない潜伏感染細胞と非感染細胞を識別することが困難であることと、実際の感染者体内における潜伏感染細胞の頻度が低いことの2点である。これらの問題点を克服し、潜伏化成立における宿主エピジェネティック制御の役割を明らかにするべく、本研究では独自の dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)を作製した。この dual color reporter の利点は以下の4点である。まず1点目として、安定的な活性をもつ EF-1 promoter から mRFP をトレーサーとして発現させることにより、感染細胞集団を LTR の活性の有無によらず検出することができ、従って感染細胞集団全体の LTR 活性の評価を可能にした点である。従来の潜伏感染細胞の樹立には LTR 活性の無い細胞集団からプロウイルスをもつ細胞を株化するプロセスが必要であったが、本研究で作製した dual-color reporter を用いることにより、感染後の早い時期から LTR の活性の抑制の過程を観察することが可能である。2点目は、single-round 感染系を採用した点である。二次感染を防ぐことにより、レポーター導入後に LTR に蓄積するエピジェネティックな変化を経時的に解析することが可能となった。3点目は HIV-1 の遺伝子をほとんど欠損させ、LTR からの転写制御に重要な *Tat* のみを搭載した点である。ウイルス遺伝子を欠損させることで感染細胞に対する細胞毒性を低下させ、野生株 HIV-1 では低頻度にしか成立しない潜伏感染細胞の成立効率を高くすることが可能となった。4点目は LTR のプロモーター活性の指標として下流の Venus を搭載させた点である。Venus タンパク質は GFP タンパク質と比較して細胞毒性が低く、また蛍光強度も強いことから LTR のプロモーター活性を Flowcytometry により簡便に解析することが可能となった。また蛍

光タンパク質の発現は細胞の固定・染色などの操作なく観察でき、同時に二次感染を起こさないことから感染した生細胞を安全に分取することが可能である。

一方、このレポーター導入系には欠点も存在する。まず1点目は欠損させたウイルス遺伝子群による潜伏化への影響を考慮できない点である。このことから、レポーター導入系で見られた現象は野生型株や野生型に近いモデルを用いて検証する必要がある。2点目は *in vitro* のレポーター導入系では潜伏化成立への免疫学的な圧力の影響が考慮出来ない点である。*In vivo* の感染系ではウイルス遺伝子を発現する細胞は CTL により排除され、一部の細胞でのみ潜伏感染が成立すると考えられている。*In vitro* のレポーター導入系は、このような外部からの影響を排除し、感染細胞単独のウイルス遺伝子の発現の動的変化の観察のみに特化したモデルである。また3点目としては、LTR の下流に従来存在しない強力なプロモーターの構造をもつ点である。本研究で作製したレポーターでは構造を単純化するために、LTR と下流の EF-1 promoter が約 2kb 程度しか離れておらず、プロモーター同士の干渉が起こる可能性が考えられる。この可能性を検証するために LTR の下流の EF-1 promoter 及び mRFP を欠損させた single-color reporter を作成し、同様の実験を行った (Fig. 6 B)。その結果 single-color reporter を導入した場合においても、LTR 活性の時間依存的な抑制が観察され、また dual-color reporter 導入細胞と同様に、感染初期に LTR の活性が強い集団と弱い集団が存在することが観察された。しかし single-color reporter 感染細胞では dual-color reporter 感染細胞と比較して Venus の発現が全体的に強い傾向が見られた (Fig.7 B)。この結果から下流の EF-1 promoter の存在により LTR の活性が弱められている可能性が考えられた。

このように新たに作製したレポーター導入系には利点と欠点が存在するが、これまでの潜伏化成立研究が抱えていた問題点を克服しており、従って本研究で得られた知見は潜伏化成立の理解に貢献すると考えられる。

本研究では dual-color-reporter を Self-inactivating レンチウイルスベクターを用いて宿主細胞に導入している。本研究で用いたウイルスベクターは HIV-1 を基本骨格としており、リコンビナントウイルスのゲノム RNA は 5' 末端に U3、R 領域を、3' 末端には R、U5 領域を持っているが、U3 のプロモーター活性に重要と考えられる転写開始点から-141~-9塩基を欠損している。従ってリコンビナントウイルスから出来るプロウイルスの 5'LTR の U3 領域はプロモーターとしての機能を有さない。本研究で Dual-color reporter として導入した LTR 中の R 領域の配列はレンチウイルスベクターの R 配列と相同性が高く、逆転写の際にウイルスゲノムの 5' 末端の R として利用される可能性が考えられた。このような構造のプロウイルスが出来るかを、レトロウイルスの逆転写のメカニズムを元に検討した。その結果、一般的に HIV-1 の逆転写の過程において、(+鎖 DNA の合成時に起こる second strand transfer では 3' 末端側の polypurine tract (PPT)から伸長してきた DNA 合成が(-鎖を鋳型にして(-鎖の末端である U5 まで伸長し、primer binding site (PBS)の相補性を利用して(-鎖の 3' 末端を鋳型に DNA 合成が行われる。本研究でレポーターの直前に挿入した LTR 配列は PBS を搭載していないため、second strand transfer の際に認識されることは理論上ないと考えられた。しかしレポーターの直前の LTR が second strand transfer の過程で認識された場合には、レポーターの直前の LTR が U3 に欠損をもつものになってしまい、レポーターの発現が低下・消失する原因となることが予想される。

このようなリスクを検証するために、レポーター感染細胞中の IRES-Tat の直前の LTR 配列を解析した。レポーターの U3 領域と IRES にレンチウイルスベクターの U3 の欠損領域を挟むように設計した primer を用いて、Venus(-)と Venus(+))の集団から感染 12 日目に抽出した genome DNA を鋳型にして PCR を行った。Forward primer はレンチウイルスベクター由来の U3 とレポーター直前で共通の領域に設計した。感染初期に分取した Venus(+))集団由来の配列は配列を確認した 6 クローン全てが intact な LTR であった。一方、Venus(-))の集団由来の複数のクローンで Venus 直前の LTR 配列を確認した結果、12 クローン中 6

クローンが intact な LTR 配列をもち、6 クローンが defective な LTR を持っていた。この結果から、Venus(-)の集団の一部は、U3 の欠損によって Venus の発現が低下している可能性があると考えられた。またこの実験から Venus(-)の集団中には intact な LTR 配列をもつ集団も存在することが同時に確認された。このことから、intact な LTR を持つにも関わらず、感染初期からプロモーターの活性が抑制された集団が存在する、という本論文の趣旨には変更はないと考えている。

## 2. 潜伏化成立に関わる LTR 活性の 2 つの抑制経路について

本研究では新規に作製したレポーター系を用いて、LTR の抑制メカニズムが導入直後の急激な抑制と経時的な抑制の 2 通りのメカニズムであることを初めて明らかにした。この 2 つの潜伏化成立経路の存在は過去の潜伏化モデルの樹立方法から経験的に想定されていたモデルと一致するものである。

感染直後に LTR が抑制されている感染細胞集団を潜伏化モデルとしている報告としては、Jordan らと Bosque らの報告がある。Jordan らが用いた潜伏化モデル J-Lat 細胞は、GFP を搭載した single-round HIV 感染後に GFP の発現しない集団を分取し限界希釈によって株化し、プロウイルスを保持していた細胞株を潜伏感染細胞として樹立したものである(Jordan et al., 2003)。また Bosque らが潜伏化 HIV の再活性化シグナルの探索に用いた Ex vivo 潜伏化モデルでは、primary CD4 T 細胞を Th0(Naïve Tcell)、Th1、Th2 に分化する条件で培養した後、HIV-1 を感染させて潜伏化集団、作製したものである。このモデルでは感染 3 日目にはウイルス遺伝子の発現が見られなかったが、感染 7 日目には CD3/CD28 抗体刺激によって再活性化することが可能な感染細胞が culture 中に存在していることが示されている(Bosque et al., 2011)。

一方 Lewinski らは、感染直後に LTR 活性が強い感染細胞から経時的に抑制された集団を潜伏化モデルとして採取し、潜伏化とインテグレーションサイトの関連を解析し

ている。また Kurn 博士らのグループが一連の研究で用いている Jurkat 細胞の潜伏化モデルは、Jurkat に対して GFP を搭載した single-round HIV を感染させた後、GFP を高発現していた集団を分取して株化し、長期培養によって LTR の活性レベルが低下した集団である(Friedman et al., 2011; Pearson et al., 2008)。また彼らは primary CD4 T 細胞を用いても同様に潜伏化モデルを樹立している(Tyagi et al., 2010a)。また本研究で用いた HeLa/LTR-luciferase も導入直後は luciferase の活性が見られ、長期培養によって抑制状態に入ったものであり、広く使用されている。

このように、成立メカニズムの異なる潜伏化モデルが各グループによって用いられてきた。成立のメカニズムは異なるが、どちらの経路で成立したモデルも潜伏化モデルとして認められており、これらを用いて潜伏化の維持に関わる LTR からの転写抑制メカニズムや LTR の再活性化のメカニズムが報告されている。一方、本研究では、トレーサー遺伝子を発現する独自のレポーターを用いて、潜伏感染細胞を可視化することにより、これまでに経験的に考えられてきた2つの LTR 抑制経路の存在を同時に証明することが出来た。また約 50%の感染細胞で感染初期から LTR の活性が抑制されているという驚くべき結果を得ることができた。

### 3. 同様のレポーター導入系との比較

本研究で作製した dual-color-reporter と同様に蛍光タンパク質をトレーサーとして用いた潜伏化 HIV の研究が近年相次いで発表されている。以下に3例の報告を紹介し、本研究との合致点及び相違点を考察する。

Carter らは HIV molecular clone p89.6 をもとに感染細胞にトレーサーとして GFP を発現する 89.6-ΔE-SF-GFP というレポーターを作製した。彼らはこのウイルスを CEM、活性化 PBMC、及び造血幹細胞に感染させ、GFP の発現と抗 gag 抗体を用いた染色により gag 遺伝子の発現を検出することにより、感染初期から ウイルス遺伝子の発現がない

感染細胞が存在することを示している(Carter et al., 2010)。 彼らはこのウイルスを含めた複数のウイルス株を用いて、HIVに感染した造血幹細胞における細胞死と潜伏感染の成立を示している。

Benhardらは2013年に、LTR-dsREDとプロウイルスの内部にE1F $\alpha$  promoter GFPを搭載したpTY-LAI dsRed reporter mini virus という構造のレポーターを用いて、YY1の潜伏化への影響を解析している。彼らはこのレポーターを導入して24時間から72時間の間にdsREDとGFPを共発現する細胞集団とGFPのみを発現する細胞集団が存在すること、また感染初期におけるdsRED陰性の細胞集団の存在を報告している。また彼らはこの感染初期のdsRED陰性細胞を分取し、LTRの活性が抑制された集団におけるupstream RBEIII region、enhancer region (ER)、及びRBEI/transcription start site regionへのYY1の結合量が多いこと、またYY1結合配列に変異を導入したレポーターにおける抑制の解除とYY1の局在の解除を報告している(Bernhard et al., 2013)。

Calvaneseら2013年に、潜伏化HIVを再活性化する薬剤のスクリーニング系としてトレーサーを用いた潜伏感染モデルを報告している。彼らはCarterらが用いた89.6- $\Delta$ E-SF-GFPをもとに、Nef遺伝子領域にmAppleのORFを挿入した89.6/DNE/mApple/SFG(89mASG)と、JordanらのHXB2由来 R7/3 cloneをもとに、EF1 $\alpha$ -mCherryをNef遺伝子領域の下流に挿入したR7/E-/GFP/EF1 $\alpha$ -mCherry (R7GEmC)を作製し、感染3日目からLTRの活性が無いもしくは低い感染細胞集団が観察されることを報告している。彼らはこの集団を潜伏感染細胞集団として分取し、インテグレーションサイトに依存しない薬剤のスクリーニング系として利用している(Calvanese et al., 2013)。

上記のように、近年になりHIV感染とLTRの活性の両者を指標とした潜伏化研究が報告され始めている。本研究では、感染初期からLTRの活性が抑制された感染細胞の集団の存在を示している点で、これまでの報告と一致している。しかしこれまでの報告では

同時に2つのLTR活性の強度が異なる集団を分取し、分子レベルでの比較検討は行われていない。本研究では感染初期にLTRの活性化レベルが異なる二つの感染細胞集団に注目し、それぞれから潜伏感染が成立することを示した。感染から慢性感染成立までのLTRの活性の変化を明らかにし、2つの集団で起こっている抑制メカニズムの一端にそれぞれ宿主のエピジェネティックな制御が関与することを明らかにした。また成立メカニズムが異なる潜伏感染細胞の違いを明らかにした点は本研究の独創的な結果である。

#### 4. 感染初期の LTR 抑制におけるエピジェネティクス

感染初期の急激な LTR 抑制に関わるメカニズムを解析したところ、大きなレポーター配列の欠損は確認されず、TNF- $\alpha$ 処理や PMA/Ionomycin 処理によって再活性化可能であった。また RNA レベルの発現低下が見られたことから、転写レベルでの抑制の可能性が考えられた。そこで、LTR のプロモーター活性の制御に関わる宿主エピジェネティック制御系に注目した。狭義のエピジェネティック制御には、DNA のシトシン塩基のメチル化修飾や、ヒストン化学修飾などの様々な階層がある。まず感染初期に LTR の活性が異なる 2 集団 (Venus(+))及び Venus(-)) について、LTR 周辺の 11 か所の CpG site での DNA のメチル化修飾を bisulfate sequencing 法によって解析した結果、Venus(-)、Venus(+))の両集団ともに LTR 上のメチル化は検出されなかった。続いて転写制御に関わることが知られているヒストン修飾について ChIP assay によって解析を行った。ヒストン修飾のレベルの違いを Venus(-)集団及び Venus(+))集団間で比較した結果、Venus(-)の集団では LTR の promoter 領域での H3K27me3 修飾の蓄積と AcH3 及び H3K4me3 修飾レベルの低下が観察された。

感染初期から LTR の活性が抑制されている集団中の LTR に H3K27me3 修飾が蓄積していたことから、H3K27me3 を制御する宿主因子 PRC2 が感染初期の LTR 活性に影響するか検証した。その結果、PRC2 の主要因子である EZH2 及び SUZ12 のノックダ

ウンによって感染初期の LTR の活性が増加することがレポーター導入系において観察された。また single-round HIV 感染系においても、PRC2 のノックダウンもしくは EZH2 の阻害剤である DZNep の前処理によっても同様の結果が得られた。これらの結果から宿主因子 PRC2 が感染初期の一部の細胞集団において LTR の活性を抑制し、その結果ウイルス遺伝子発現が低下する集団が成立することが示唆された。

本研究中においては Jurkat、CEM、SupT1、293T 細胞に Dual-color reporter を感染させ、感染初期の LTR の活性を解析した。この結果から細胞の種類に依存せず、感染初期には LTR の活性が強い集団と弱いまたは全く見られない集団が存在することを見出した。細胞の種類によって Venus(-) と Venus(+) の集団の割合に違いが見られたが、これは細胞間で異なる点であったが、大きく 2 つの集団に分かれるという点においては共通の現象が観察された。このことから、この Venus(-) の集団での抑制メカニズムの検証は最も 2 つの集団が顕著に分かれた Jurkat 細胞を用いて行った。今後さらに多くの細胞株や正常 T 細胞を用いて検討することで、潜伏化のメカニズムの詳細な分子メカニズムが明らかにできると考えられる。

## 5. LTR 活性の経時的な抑制における宿主エピジェネティック制御の役割について

Dual-color reporter を感染させた Jurkat 細胞を培養し、各段階でフローサイトメトリーによって解析を行った結果、Venus(+) 細胞の割合は感染 4 日目にピークになり、その後減少する様子が観察された。この結果から、感染初期の Venus(+) の集団で Venus の発現が抑制された可能性と、異なる 2 集団の細胞増殖及び生存能の違いによる影響が考えられる。

実際に感染初期に Venus(-)、Venus(+) の集団を分けて培養したところ、2 つの集団間で増殖能に大きな違いはなかった (data not shown)。また Venus(+) の集団を分取して培養したところ、経時的に Venus(-) の集団へとシフトしていく様子が観察された (Fig.17 A)。



この結果から Fig.5 で観察された Venus(+)集団の減少は集団間の増殖能の違いではなく、Venus(+)集団における LTR の抑制であることが示唆された。

本研究では、潜伏化の成立メカニズムの全体像を明らかにするために、感染初期に LTR の活性が高かった感染細胞集団(Venus(+))も分取し、通常の培養条件下における LTR 活性の経時変化を観察した。その結果、Jurkat 細胞では、LTR の活性は 5 から 6 日目にピークを迎え、感染後約 50 日で一定の値を示した。この経時的な抑制に LTR 上のエピジェネティック変化の関係性を明らかにするために、感染後 12 日目と 120 日目の細胞で LTR 上の抑制的なヒストン修飾の蓄積レベルを比較したところ、H3K9me3 及び H3K27me3 レベルが 120 日目のサンプルでは増加し、逆に AcH3 のレベルには減少傾向が見られた。また感染初期に分取した LTR の活性が高い集団に DZNep を低濃度で処理し続けた結果、LTR の活性の抑制状態へのエントリーが阻害された。また EZH2 に対してより高い特異性を有する阻害剤である GSK126 を同様に処理した場合にも LTR の不活性化に対して濃度依存的な作用したことから、LTR の経時的な抑制に対する PRC2 の関与が示された。また DZNep または GSK126 と SAHA の共処理を行った結果、阻害剤による生存への影響から培養が 10 日間しか継続できなかったが、より強力に LTR の活性が保たれ、抑制状態へのエントリーが阻害された。この結果から、①LTR の活性の経時的な抑制の過程で、転写抑制的なヒストン修飾が LTR 上に蓄積していること、②PRC2 と HDAC は協調して LTR の経時的な抑制に関わっていることが明らかとなった。

また感染初期から LTR の活性が抑制されていた Venus(-)の集団においても感染後 12 日目と 120 日目の比較から、長期培養によって H3K27me3 がさらに蓄積し、また H3K9me3 が LTR 上に導入されることがわかった。また導入 120 日目の Venus(-)と Venus(+)集団の LTR のエピジェネティック制御の比較したところ、どちらの集団でも 120 日目における H3K9me3 及び H3K27me3 の蓄積が見られたが、そのレベルは

Venus(-)集団の方が高いことが明らかとなった。この結果から H3K27me3 は感染初期において LTR の活性を抑制し、感染初期の急激な潜伏化の成立に関わるヒストン修飾であるとともに、感染後の徐々に LTR 上に蓄積し、より強力な転写抑制に関与する可能性が示唆された。また H3K9me3 は感染初期には LTR 上に存在せず、感染後の時間を経て、徐々に蓄積し経時的な抑制に関与する修飾であることが明らかとなった。

HIV の転写制御に関わる宿主エピジェネティック制御については、これまでに以下のような報告がある。DNA のメチル化に関しては、これまで、HIV 慢性感染細胞株 ACH2 や single-round HIV-1 感染 Jurkat 細胞の LTR の活性の違う複数の clone を用いた解析によって LTR 上とその周辺領域に存在する 11 か所の CpG site が HIV-1RNA の発現抑制に関わるということが報告されている(Ref)。 HIV 潜伏化と LTR 周辺のヒストン修飾の関連の報告としては、ヒストンアセチル化修飾に関しては、NF- $\kappa$ B のホモダイマー、Sp1 と c-Myc、LSF-1 と YY1 が LTR 上に HDAC1 をリクルートし、Nuc1 の脱アセチル化を行い、転写抑制に関わるということが報告されている。またヒストンメチル化修飾に関しては、Suv39H1 による H3K9me3 が HP1 をリクルートしヘテロクロマチンが形成すること、G9a による H3K9me2、EZH2 による H3K27me3 修飾が慢性感染期の LTR の抑制に関わるということが報告されている。また転写活性化に関わるヒストン修飾としては、Tat 存在下で LTR 周辺の H3K4me3 が促進されること、P-TEFb と相互作用し HIV の転写伸長を促進する SKIP/SNW1 が H3K4 メチル化修飾を行う MLL1complex の構成因子である Menin と相互作用することが報告されている(Bres et al., 2009; Zhou et al., 2004)。

本研究では新たに作製した dual-color reporter を用いて感染直後から抑制状態に至るまでの過程で宿主のエピジェネティック制御因子がどのように LTR の活性の制御に関与するか注目した。その結果、感染初期の LTR 活性の抑制に LTR 上の H3K27me3 修飾とその制御因子 PRC2 が関与していることを明らかにした。また PRC2 が慢性感

染細胞である U1 細胞や潜伏化モデル細胞である HeLa/LTR-luciferase 細胞における LTR 活性の抑制にも関与していることを示した。慢性感染細胞における EZH2 による LTR 活性の抑制に関する結果は Freidman らが 2011 年の Jurkat の潜伏感染モデル E4 clone を用いて報告したメカニズムと一致するものである。本研究では、これまで慢性感染期の LTR 活性の抑制との関連が報告されてきた宿主エピジェネティック制御の中でも PRC2 による抑制が感染初期の LTR の抑制に重要であることを初めて明らかにした。また EZH2, SUZ12 のそれぞれのノックダウンを用いて PRC2 が複合体として LTR の制御に関わること、感染細胞内での PRC2 の発現量・活性が感染初期のウイルス遺伝子の発現に影響を与えることを初めて示した。

一方、これまで HIV の転写抑制に関与することが報告されていた H3K9me3 修飾は感染直後の LTR の活性の抑制には関与せず、感染後時間を経て LTR 上に蓄積し、LTR の経時的な抑制に関与する修飾であることが考えられた。

## 6. 潜伏化成立への他のウイルス遺伝子の影響の解析

本研究で作製した dual-color reporter はウイルス遺伝子をほとんど欠損させ、LTR からの転写制御に重要な Tat のみを搭載した。このレポーターを用いて潜伏化成立を解析した場合には Tat 以外のウイルス遺伝子の潜伏化の影響は考慮できない。この問題を解決するために、single-round HIV 感染系を用いることにより、dual-color reporter を用いて得られた現象の検証を行った。この single-round HIV においても感染初期からウイルス遺伝子の発現が抑制された感染細胞集団が存在すること、その抑制に PRC2 が関与することは実験的に示されたが、他のウイルス遺伝子が潜伏化にどのように寄与しているかは不明である。

HIV は 9 つのウイルスタンパク質をコードしている。HIV-1 のアクセサリタンパク質である Vpu はウイルス粒子の放出を促進することや、Vif はウイルス粒子のアセン

ブリに重要な役割を果たすウイルス粒子の産生の効率を促進することが報告されている。しかし LTR のプロモーター活性に直接関与し、転写レベルでのウイルス遺伝子の発現に影響することが報告されているのは調節タンパク質である Tat のみである。HIV-1 アクセサリータンパク質である Vpr は Cdc2 と cyclin B の複合体を阻害することで感染細胞の細胞周期を G2/M 期に停止させることが報告されている。G2 期には LTR の転写活性が活性化することが報告されていることから、Vpr が感染細胞の細胞周期の制御を介して LTR の活性に影響し、潜伏化成立に寄与する可能性もあると考えられる。本研究で作製した Dual-color reporter は LTR の直下に Tat が搭載されているが、この領域にウイルスタンパク質を載せ替えることで他のウイルスタンパク質が潜伏化成立に与える影響を検証するためのツールとして利用できると考えている。

## 7. 感染細胞集団中に heterogeneity を形成する要因について

本研究では潜伏化成立のメカニズムや成立メカニズムの異なる潜伏感染細胞の違いについて宿主のエピジェネティック制御因子に注目して解析を行い、LTR 上のエピジェネティック制御のレベルの違いが感染初期の LTR 活性や潜伏感染細胞集団の性質の違いに貢献することを示した。しかし実際には宿主のエピジェネティック制御とインテグレーションサイトは密接に関連している。また宿主因子の発現も感染後のウイルス遺伝子の発現に影響することが考えられる。そこで感染細胞の heterogeneity の形成に影響を与える可能性のあるその他の因子について考察する。感染細胞中に heterogeneity を形成する要因としては、大きく分けて、①細胞側、②ウイルスと宿主の相互作用（インテグレーションサイト）、③ウイルス側の3つの要因が考えられる。

まず①細胞側の要因としては、感染初期に Venus(-)、Venus(+)になる集団間での宿主因子の発現・活性の違いや細胞の性質の違いが考えられる。特に、2つの集団間での LTR 活性化に関わるシグナル伝達系の活性の違いや転写制御や転写伸長に関わる因子

の発現の違いが予想される。一般的に休止状態のリンパ球では、タンパク質レベルでの発現制御や局在の制御によって転写因子の活性が低いことが知られている。HIV の遺伝子の発現制御に影響することが報告されている主な転写因子は NF- $\kappa$ B、NFAT、Sp1、AP-4 がある。NF- $\kappa$ B、NFAT はアセチル化酵素をリクルートし、転写開始を促進する。Duverger らは Jurkat 細胞を用いて感染時に NF- $\kappa$ B の活性が低い細胞では潜伏化が成立しやすいと報告している。彼らは PMA や prostratin の処理により NF- $\kappa$ B を活性化した細胞では潜伏化の成立が阻害されることを示した。Burnett らは LTR 上の Sp1 sites と  $\kappa$ B sites の mutation によって、潜伏化が誘導されることを報告した。Duverger らは転写開始点以降の AP-4 サイトが潜伏化の成立に重要であることを示した。これらの報告によって、LTR の活性化に関わる転写因子の発現や活性化レベルの変動が潜伏化の成立に影響することが示されているが、実際に感染細胞側にこれらの因子の活性化レベルの heterogeneity が存在するか、またこの宿主因子の活性の違いが潜伏感染の成立に寄与するかは明らかにされていない。本研究で見出した 2 つの潜伏感染細胞集団でこれらの因子の発現や活性化レベルの違いを解析することで、感染細胞側の heterogeneity のウイルス遺伝子発現への影響が明らかにできるのではないかと考えている。

また感染初期にウイルス遺伝子の発現レベルの異なる 2 つの集団において CDK9、cyclinT1 やそれらの抑制因子である HEXIM の発現レベルが異なる可能性が考えられる。Tyagi らは primary の CD4 陽性 T 細胞を用いて潜伏感染細胞では転写伸長因子である P-TEFb を構成する CDK9 と cyclinT1 の発現が低下していることが LTR 抑制の主なメカニズムであることを報告している(Tyagi et al., 2010b)。この報告から、転写伸長因子やその制御に関わる因子の発現レベルの違いが、感染細胞中の heterogeneity の形成に関与に寄与する因子である可能性が考えられた。

また LTR の発現抑制に関わる宿主因子の発現レベルの細胞間での違いが感染初期の

LTR の活性を制御している可能性も考えられる。この可能性を検証するために、本研究により感染初期の LTR の抑制に重要と考えられた PRC2 構成因子の発現レベルを感染初期に分取した 2 つの集団間で比較した。感染初期に分取した Venus(-)及び Venus(+) の集団間で、PRC2 因子の発現量を RT-realtimePCR を用いて検討した結果、2 つの集団間には EZH2,SUZ12 の発現量に顕著な違いは見られなかった(data not shown)。これまでに報告されている PRC2 の主要因子の発現制御メカニズムとしては、pRB-E2F の下流で EZH2,EED の発現が制御される(Bracken et al., 2003)、また乳がん細胞では MEK ERK 経路が EZH2 の発現を増加させることが報告されている(Fujii et al., 2011)。これらの報告から感染細胞集団中の pRB-E2F 経路や MRK ERK 経路の活性化のレベルの heterogeneity が PRC2 の発現の heterogeneity の形成している可能性があるのではないかと予想したが、2 つの集団間で PRC2 の因子の mRNA レベルでの発現に顕著な違いは見られなかった。

上記した PRC2 の因子の発現レベルやその制御メカニズムは宿主側の heterogeneity の一例であるが、このような宿主側の違いが感染細胞の heterogeneity 形成に寄与している可能性に関しては、網羅的に検証するためには、2 つの集団間でのマイクロアレイを用いた発現解析を行うことにより有用な情報が得られるのではないかと考えている。

続いて②ウイルスと宿主の相互作用の感染細胞中の heterogeneity 形成への影響の可能性として、インテグレーションサイトとその近傍の遺伝子の発現が考えられる。インテグレーションサイト近傍に強いプロモーターや逆向きのプロモーターが存在していた場合には RNA pol2 を競合することになり、LTR の活性が落ちることが考えられる。またインテグレーションサイト近傍の遺伝子の発現がレポーターの挿入により乱され、細胞の性質に影響する可能性も考えられる。

インテグレーションサイトについては以下のような報告がある。一般的な HIV のインテグレーションの領域特異性については、HIV のインテグレーションサイトは転写

が活発な遺伝子であることが Schroder らによって報告された。彼らは SupT1 細胞に HIV-1 または HIV-1 based vector を感染させ、48 時間後に DNA を採取し 524 個のインテグレーションサイトについて近傍の領域を解析した(Schroder et al., 2002b)。

インテグレーションサイトと潜伏感染の関連についての報告としては、Han らは 16 人の HAART 療法中の感染者の末梢血由来の CD4 陽性 T 細胞から 74 個のインテグレーションサイトを同定した(Han et al., 2004)。彼らの解析では、インテグレーションサイトの 93%が転写 unit の中に存在し、91%が resting CD4 陽性 T 細胞で転写が活発な遺伝子であった。Brady らは休止期 CD4 陽性 T 細胞と活性化 CD4 陽性 T 細胞に HIV を感染させ、2661 個のインテグレーションサイトを次世代高速シーケンサーを用いて網羅的に解析し、ゲノム上のヒストン修飾や CpG site との関連を解析した。その結果、休止期/活性化 CD4 陽性 T 細胞のどちらでも転写 unit 内にインテグレーションの頻度が高いことがわかった。またヒストン修飾との関連としては転写活性化に関わる H2BK5me1、H3K4me1,2,3、H3K9me1 と正の相関を示し、転写抑制に関わる H3K9me2,3、H3K27me3 とは負の相関を示すことが明らかとなった(Brady et al., 2009)。また Lewinski らは LTR の活性が徐々に抑制された感染細胞集団を TNF- $\alpha$ 処理により再活性化し、誘導可能であった 971 個のインテグレーションサイトを解析し、その 40%が長い遺伝子間領域、aliphoid repeat、転写量の多い遺伝子の近傍の 3 つの特徴に分類されることを報告している(Lewinski et al., 2005)。

上記のように、これまでインテグレーションサイトと潜伏化の関係は多く報告されてきた。しかしこれらの報告で解析された材料は本研究で見出した 2 つの潜伏感染細胞集団のどちらか一方の集団や混合集団である。本研究で見出した再活性化刺激への応答性の異なる集団間のインテグレーションサイトの偏りの違いはまだ明らかにされていないことから、この 2 つ集団間のインテグレーションサイトの解析は潜伏感染細胞集団中に存在する heterogeneity の成立のメカニズムを知るうえで重要な知見となると考えら

れる。

## 8. 生体内での潜伏感染細胞集団中の heterogeneity の存在について

本研究では dual-color reporter を用いて感染初期の LTR の活性が異なる集団が存在していること、この集団から成立する潜伏感染細胞集団は性質が異なることを見出した。Fig.19 で示している再活性化刺激に対する応答性の違いは再活性化刺激の処理を行っても発現誘導が起こらない Venus(-)集団が存在することを反映している。本来、成立メカニズムの異なる潜伏感染細胞集団間の再活性化刺激への応答性の違いを議論するためには、感染 120 日目において、それぞれの集団から Venus(-)の集団を改めて分取し、どのくらいの割合の細胞が Venus(+)に移行したかを評価する必要があると考えている。

今回の実験では、長期培養後の細胞をそのまま再活性化実験に持ち込んだ。Venus(+)  
の集団では長期培養後も Venus(+)  
の細胞集団が約 30%存在することから、Venus(+)  
集団へ移行した集団の割合の変化では再活性化刺激への応答性が評価しにくかった。そこで今回の Fig.19 のデータは感染初期に分けた 2 つの集団の、120 日培養後の集団全体の LTR の活性の絶対値として Venus の MFI を比較した。

成立メカニズムの異なる潜伏感染細胞間では再活性化刺激に対する応答性が異なるという結果は、感染細胞中には感染初期のウイルス遺伝子の発現レベルや再活性化刺激への応答性に関する heterogeneity が存在することを示唆している。従来、潜伏化感染細胞でのウイルス遺伝子発現抑制の強度や再活性化刺激への応答性の違いはクローン間の違いと考えられてきた。本研究で得られた知見は、潜伏感染細胞集団中の heterogeneity の存在を初めて示した点、感染初期の LTR の活性の強さによって性質の違う潜伏感染細胞を分けることができることを示した点において新規性がある。

実際に感染者体内の潜伏感染細胞中に heterogeneity が存在については、報告がない。しかし 2013 年に Silliciano 博士のグループは感染者由来の CD4 陽性細胞の中に、従来



の *in vitro* での **virus outgrowth assay** では再活性化してこない **intact** なプロウイルスを保持した感染細胞が存在することを示している。彼らの報告によると *in vitro viral outgrowth assay* で再活性化されないプロウイルスの 11.7%はプロウイルスや LTR に欠損や変異がなく、プロウイルスから再構成されたウイルスは HIV NL4-3 株と同等の増殖能を示すことが明らかとなった。このプロウイルスにインテグレーションサイトの偏りはなく、LTR 周辺の DNA CpG site もメチル化を受けていなかった。この報告では細胞でのウイルス遺伝子発現抑制のメカニズムは十分明らかにされていないが、彼らは従来の潜伏感染細胞の定量方法では、検出できなかった **reservoir** が存在することを主張している。彼らの報告は感染者体内にも再活性化刺激への応答性が異なる潜伏感染細胞集団が存在することを示しており、潜伏感染細胞中の **heterogeneity** の存在を支持するものであると考えられる。彼らが示した *in vitro* で再活性化しない潜伏化 HIV の *in vivo* での振る舞いや、医療上の重要性はまだ十分明らかにされていないが、本研究で発見した潜伏化成立メカニズムの違いによる LTR の刺激への応答性の違いは、このように感染者体内にも存在する潜伏感染細胞の **heterogeneity** を反映している可能性がある。潜伏感染細胞中に存在する **heterogeneity** を解析するツールとしても本研究で作製したモデルは有用であると考えている。

#### 9. 感染直後の PRC2 による LTR 活性の制御と Tat による転写制御の関連について

本研究では感染直後の LTR の活性に宿主のエピジェネティック制御因子が関与することを示した。そこで、従来の感染初期のウイルス遺伝子の発現と感染細胞の表現型の決定に関して報告されてきた知見と新たに報告したメカニズムの関連について考察する。

感染後の HIV 遺伝子の発現は Tat の確率的な変動によって説明されてきた。Weinberger らはレポーター導入系を用いて、LTR の活性が Dim の集団は不安的であ

り、培養によって LTR の活性が Off の集団か On の集団に収束することを報告している。彼らはアセチル化修飾を受けない Tat の変異体と *in silico* のモデルを用いた解析から、インテグレーション前の pre-integration complex(PIC)からわずかに発現した Tat がインテグレーション後のプロウイルスに P-TEFb をリクルートし、positive feedback の回路が活性化し、一方、Tat の脱アセチル化、分解、解離などによって positive circuit は確立的に抑制され、Tat の発現が低い集団は最終的には LTR の活性が Off に落ち着くことを報告している。

Tat の確率的変動による感染初期の LTR 活性制御と本研究で明らかになった PRC2 による感染初期の抑制メカニズムがどのように関連の可能性として以下の 5 つの可能性が考えられた。

①PRC2 が逆転写からインテグレーションまでの時間に影響した可能性、②PRC2 がクロマチンの構造変化を介して、インテグレーションサイトの嗜好性に影響を与えた可能性、③インテグレーション後の LTR の周辺のヒストンの修飾のレベルを介して、Tat の発現や Tat の LTR 上への到達性に影響を与えた可能性、④PRC2 が Tat と P-TEFb の相互作用に影響を与えた可能性、⑤PRC2 が LTR 周辺のヒストン修飾のレベルの制御を介して、転写伸長の効率に影響した可能性の 5 つが考えられた。

まずインテグレーション前のイベントについて考察する。PRC2 がインテグレーションまでの過程に関わる抑制メカニズムの可能性は①、②である。①の可能性に関しては、一般的に Tat はインテグレーション後に発現するウイルスタンパク質であると考えられているが、PIC からわずかに発現することが報告されている。逆転写からインテグレーションまでの時間が変動することで PIC から発現する Tat の量が変動する可能性は十分にあると考えられる。PRC2 は HIV のインテグレーションの頻度の高いユークロマチン領域において転写が抑制された遺伝子のプロモーターに多く存在する修飾であることから、PRC2 による宿主ゲノムのクロマチン構造の変換は PIC からの Tat の

発現量に影響を与え、感染初期の Tat による LTR 活性の制御に関与する可能性がある。また②の可能性に関しても、PRC2 による宿主ゲノムのクロマチン構造の変化によってインテグレーションサイトの嗜好性が変化し、近傍の配列の影響によりプロウイルスからの Tat の発現が影響をうける可能性は十分にあると考えられる。

インテグレーション後のイベントに関する可能性としては、③④⑤がある。③に関しては、Tat 欠損レポーターと Tat 搭載レポーターを用いた感染初期の LTR 上のヒストン修飾のレベルの比較などを行うことによって、感染初期の Tat の LTR 周辺のエピジェネティック制御への影響が明らかにできると考えている。また本研究では HeLa/LTR-luciferase を用いて、PRC2 が Tat 存在下での LTR 活性を抑制することを示した。この詳細な抑制メカニズムは検証については検討を行ったが分子レベルで解明することは出来なかった。しかし PRC2 が Tat 存在下での LTR 活性を抑制するメカニズムの可能性としては、Tat の LTR への到達性、Tat と P-TEFb の相互作用、Pol2 のリン酸化などへの影響が考えられた。この結果から、PRC2 はインテグレーション後のウイルス遺伝子発現メカニズムを抑制することが示唆された。この知見は感染直後においても Tat による LTR の制御に PRC2 が関与する可能性 (③、④、⑤) を強く支持するものである。

今後、これらの可能性を検証することで、Tat と宿主のエピジェネティック制御がどのように感染初期のウイルス遺伝子発現を制御し、感染細胞の運命を決定しているかを詳細に理解できることが期待される。

## 10. PRC2 の LTR 局在メカニズムについて

H3K27me3 修飾は周囲の領域に広がっていくことが知られており、LTR における H3K27me3 修飾もインテグレーションサイトの周辺領域から広がってきた可能性が考えられる。しかし感染細胞検体のインテグレーションサイトを調べた文献によると、

HIV-1 プロウイルスのインテグレーションサイトは転写が活性化している領域である頻度が高く、転写が抑制されている領域へのインテグレーションの頻度が低いことが示されている。また一般的に HIV のインテグレーションサイトとゲノム上の H3K27me3 修飾は負の相関を示す。これら報告から LTR 上の H3K27me3 はインテグレーションサイトの周辺から広がったのではなく、LTR 配列中に PRC2 をリクルートするための配列が存在し、積極的にその領域を抑制するメカニズムが存在しているのではないかと考えられた。

これまでに報告されている PRC2 の標的遺伝子座へのリクルートのメカニズムとしては CpG rich な配列、Jrid2、また ES 細胞など未分化な細胞においては OCT4、SOX2 や DNA のメチル化修飾を酸化しヒドロキシメチル基に変換する Tet1 が関与することが報告されており、そのリクルートのメカニズムは細胞種や標的遺伝子に特異的である。また PRC2 のリクルーターとしてタンパク質以外に non-coding RNA の関与を示唆する文献も報告されている。

#### 1 1. HDAC 阻害剤、PRC2 阻害剤共処理による潜伏化ウイルスの再活性化と潜伏感染成立の阻害の可能性について

現在、潜伏化したウイルスの発現を活性化する方法として HDAC 阻害剤が注目されている。この理由として以下の4点が挙げられる。①感染細胞の種類によらずに幅広い細胞に対して作用し、潜伏化した HIV-1 の転写を活性化することができる。②さまざまな subtype の HIV-1 の転写を活性化することができる。③IL-2 処理や抗 CD3 抗体によって T 細胞を活性化させウイルス RNA の転写を活性化する方法と比較すると、新しく感染しうる標的細胞の増殖を誘導しない、また HIV-1 の感染の co-receptor となる CXCR4 の発現レベルを亢進しない。④すでに他の複数の疾患に対する治療薬として HDAC 阻害剤が用いられおり、ヒトに対するでの安全性が実証されている。その例として、フェニル酪酸はβ鎖異常ヘモグロビン症、鎌状赤血球症候群の治療に、VPA はて

んかんや躁うつ病の治療に用いられている(Collins et al., 1995; Dover et al., 1994; Johannessen and Johannessen, 2003)。また近年では SAHA が FDA に承認され、皮膚性の T 細胞リンパ腫の治療薬に用いられている(Marks, 2007)。このような特徴から、HDAC 阻害剤は HIV-1 の転写を制御する薬剤として期待されている。

実際に VPA は *in vitro* で HIV-1 の転写を活性化する。また VPA は、血液中のウイルスが検出限界以下となった ART 服用中の患者から採取された CD4 陽性 T 細胞から HIV-1 を再活性化することが報告されており、すでに小規模な臨床試験が 4 例行われている。そのうち HIV-1 リザーバーを活性化する目的で行われた 2 例のうち 1 例では強力な抗 HIV 薬療法のもとで VPA を投与した結果、4 人中 3 人でリザーバーのサイズが減少したというものである(Lehrman et al., 2005)。また 2 件の神経治療の目的で HIV-1 感染者に VPA を投与した例ではどちらもウイルス血症が再発し、リザーバーのサイズの現象はみられなかったことを報告している(Siliciano et al., 2007; Steel et al., 2006)。この原因として VPA は比較的弱い HDAC 阻害剤と考察している。従って今後はさらに強力で特異性のある他の HDAC 阻害剤の治療薬としての探索が望まれている。また他のグループは HDAC1 特異的阻害剤である SAHA が潜伏化モデルの細胞株と HAART 療法中の HIV-1 感染患者から採取された休止状態の CD4 陽性 T 細胞の両方においてウイルスの転写活性化を誘導することを示している。また Jurkat J89 GFP モデルを用いた実験から SAHA 処理によって LTR 上の HDAC1 のリクルートメントが減少することを示している。これらの結果に加え SAHA は HIV-1 の感染に必要なレセプターや活性化マーカーの発現を亢進しないことから、HIV-1 のリザーバーを活性化する HDAC 阻害剤として注目されている(Ylisastigui et al., 2004)。また近年、ART の服用によって長期間に渡り血中の HIV RNA のレベルが検出限界以下の感染者に SAHA を投与したところ、末梢血中の CD4 陽性 T 細胞中の HIV RNA の発現レベルが増加することが報告された(Archin et al., 2012)。

これらの報告をまとめると HDAC 阻害剤は *in vitro* 及び *In vivo* の HIV-1 の転写を活性化する有効な薬剤である可能性があると言うことが出来る。しかし現在のところ、これらの薬剤によって HIV-1 感染者から HIV-1 を完全に除去することは実現していない。

一方で HDAC 阻害剤を用いることのデメリットもある。ガンの治療薬としては腫瘍化した細胞に対してのみ増殖抑制効果や分化や細胞死を引き起こし、正常細胞には毒性がないと報告されている。しかし HDAC を阻害することによってさまざまな遺伝子の転写に影響を与えることも報告されている。cDNA マイクロアレイを用いた研究から、HDAC 阻害剤を処理することによって細胞内の遺伝子の 2 から 20% の発現が変化することが示されている (Bolden et al., 2006; Dokmanovic et al., 2007; Marks and Xu, 2009)。またヒストン以外のタンパク質にもその活性がアセチル化によって制御されているものがあり、これらのタンパク質の活性にも影響することで、HDAC は多くの生命現象に関与している (Caron et al., 2005; Glozak et al., 2005)。このように HDAC の標的遺伝子は広範であり、多くの遺伝子の発現に影響を持つという点は、HDAC 阻害剤の幅広い治療への応用の障害となっている。

本研究では PRC2 の阻害によって LTR の活性化を誘導できること、潜伏化成立を阻害できること、潜伏化した HIV を再活性化できることを明らかにした。PRC2 阻害剤が臨床で使用されている例はまだないが、がん治療の分野で EZH2 の阻害剤の開発が進んでいる。本研究で主に用いた DZNep には H3K27me3 だけでなくさまざまなヒストン修飾のレベルに影響することも報告されており、標的特異性には問題がある。本研究ではより EZH2 に対する特異性が高い GSK126 を用いた場合でも、DZNep と同様の効果を得ることが出来た。

さらに本研究では PRC2 阻害剤と HDAC 阻害剤の共処理によって、単剤処理よりも強力に LTR が再活性化されることが明らかとなった。PRC2 阻害剤 HDAC 阻害剤共処

理による潜伏感染細胞の活性化と潜伏化阻害の治療応用への戦略の大きな課題は、PRC2、HDAC の標的遺伝子が広範にわたるという点である。そこで PRC2 や HDAC そのものの活性ではなく、リクルーターを分子標的として阻害することで、PRC2、HDAC の下流で制御されている他の多くの遺伝子の発現に影響を与えることなく、LTR からの転写を特異的に制御できるのではないかと考えている。今後 LTR 特異的に PRC2 を局在させるリクルーターの研究が重要な課題である。

## **結論**

博士課程の研究において私は、独自の **dual-color-reporter** を作製し、感染細胞における **HIV-1 LTR** の動的变化を明らかにした。**LTR** の抑制メカニズムは感染直後の急激な抑制と活性化状態からの経時的な抑制の 2 通りであり、それぞれの過程に宿主のエピジェネティック制御が関与していることが明らかとなった。さらに異なるメカニズムで **LTR** の活性が抑制された感染細胞集団間には再活性化刺激への応答性に違いが見られ、潜伏感染細胞集団中の **heterogeneity** の存在が示唆された。本研究の成果は、**HIV** 潜伏化成立に関わる新たな知見である。



## 謝辞

本研究の機会をいただき、懇切なるご指導とご援助を賜りました、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻の渡邊俊樹教授に深甚なる謝意を捧げます。また本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導と助言を賜りました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻病態医療科学分野 山岸 誠博士に謹んで感謝いたします。

本研究の遂行に際し、終始親切なご助言とご協力を頂きました東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻 佐藤均准教授、中野和民先生、矢持忠徳博士に心から感謝いたします。

5年間の研究生生活を精神的に支え、叱咤激励してくれた Sanaz Firouzi さん、藤川大さん、西田亜季さんに感謝いたします。

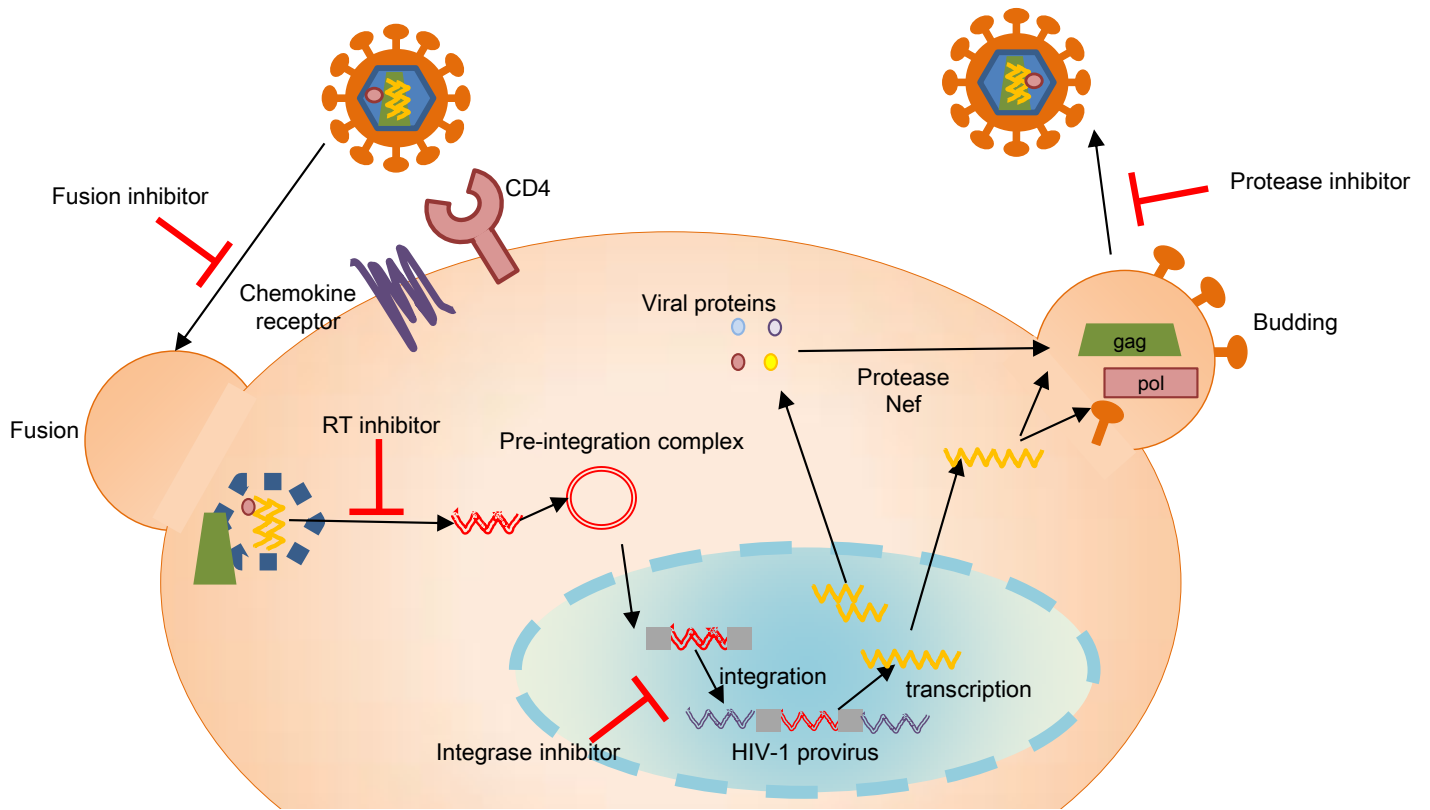
また研究室での生活を通して、私に global な視野を与えてくれた蔡迎さん、Arainga Ramirez Mariluz さん、Chi さん Ly さん夫妻に感謝いたします。

研究室での時間を共に過ごし、研究にアドバイスをくれた同級生、秘書の小林さん、丸山さん、安川さん、田村さん、坂本さんをはじめ研究室の皆様我心から感謝いたします。

5年間の忙しい研究生生活を支え、応援してくれた家族に心から感謝いたします。

图表

Fig.1

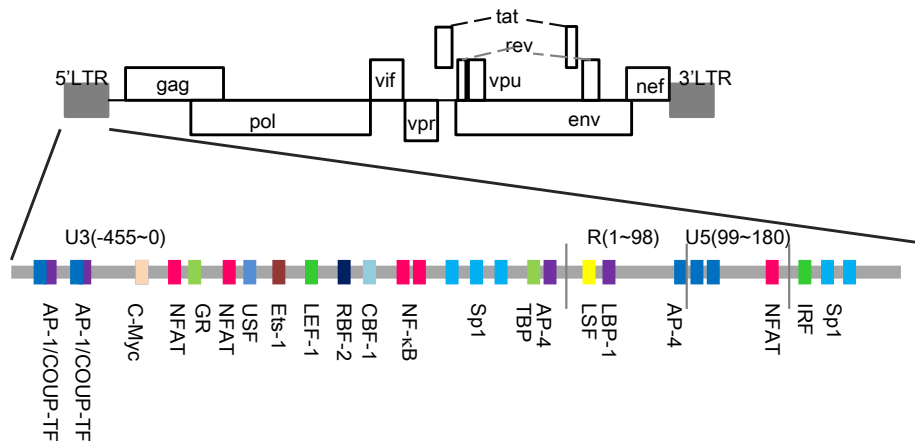


Experimental approaches to the study of HIV-1 latency. (Yefei Han, R.Siliciano et al 2007 Nature) をもとに作図。

Fig.1 HIV-1の複製機構と抗HIV薬のターゲット

Fig.2

A



Molecular control of HIV-1 postintegration latency: implications for the development of new therapeutic strategiesをもとに作図

B

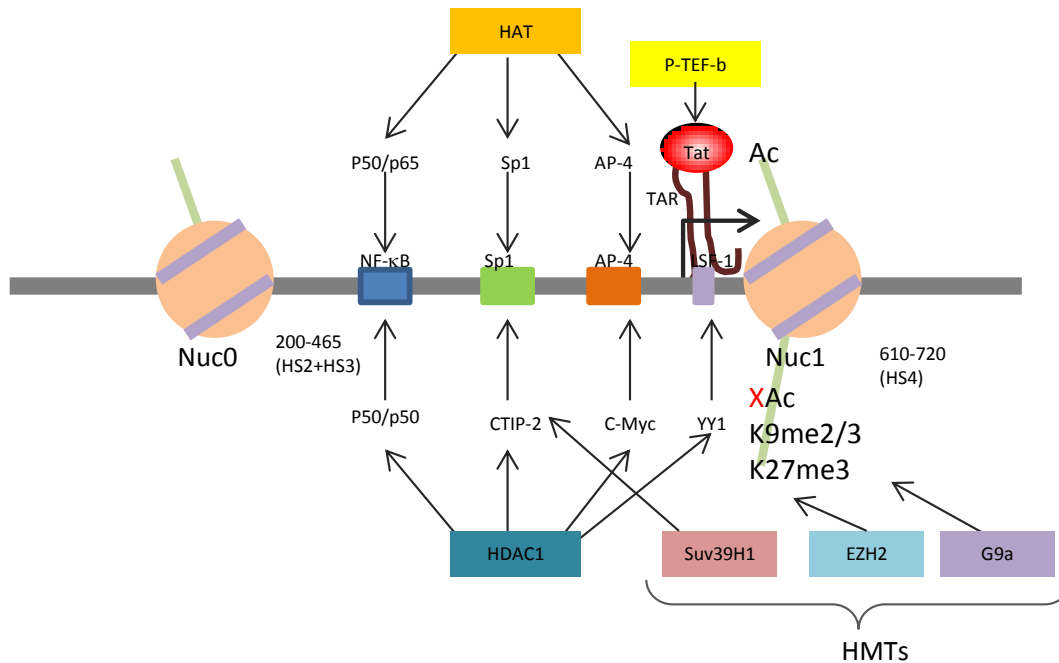


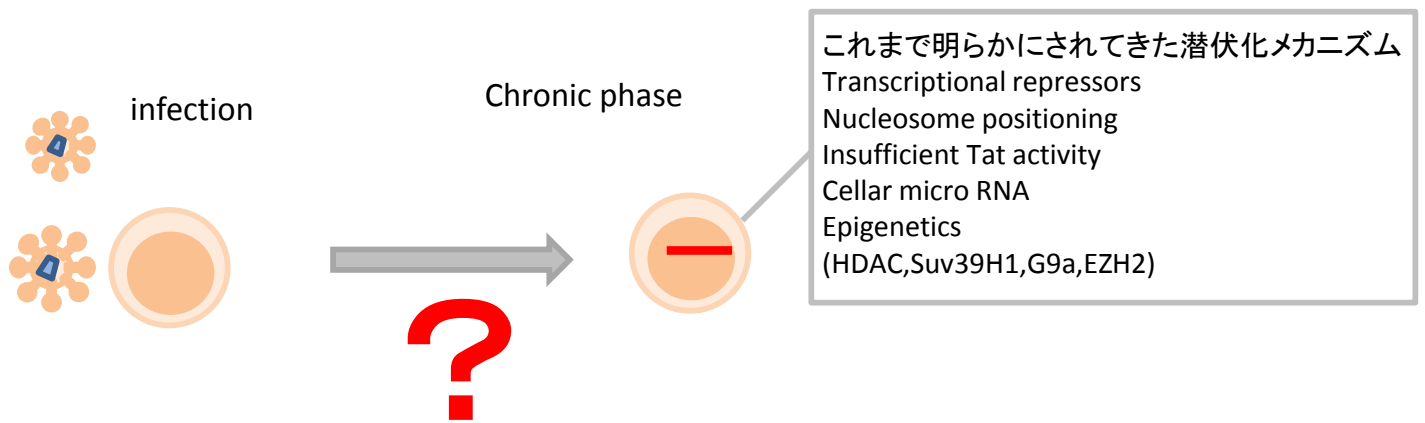
Fig.2 LTR配列の一次構造と主なウイルス遺伝子の発現制御メカニズム

(A) HIV genome構造とLTR上の転写因子結合配列

(B) 主なウイルス遺伝子発現制御メカニズム

プロウイルスのLTR領域のとりnucleosome構造と主な転写制御メカニズムを示した。図の上段に転写活性化に関わるメカニズムを下段に転写抑制に関わるメカニズムを示した。矢印は局在のメカニズムを示している。

Fig.3



### 潜伏化研究の主な障害

- ①潜伏感染細胞と非感染細胞を識別が困難であること
- ②生体内での潜伏感染細胞の存在頻度が低いこと

Fig.4

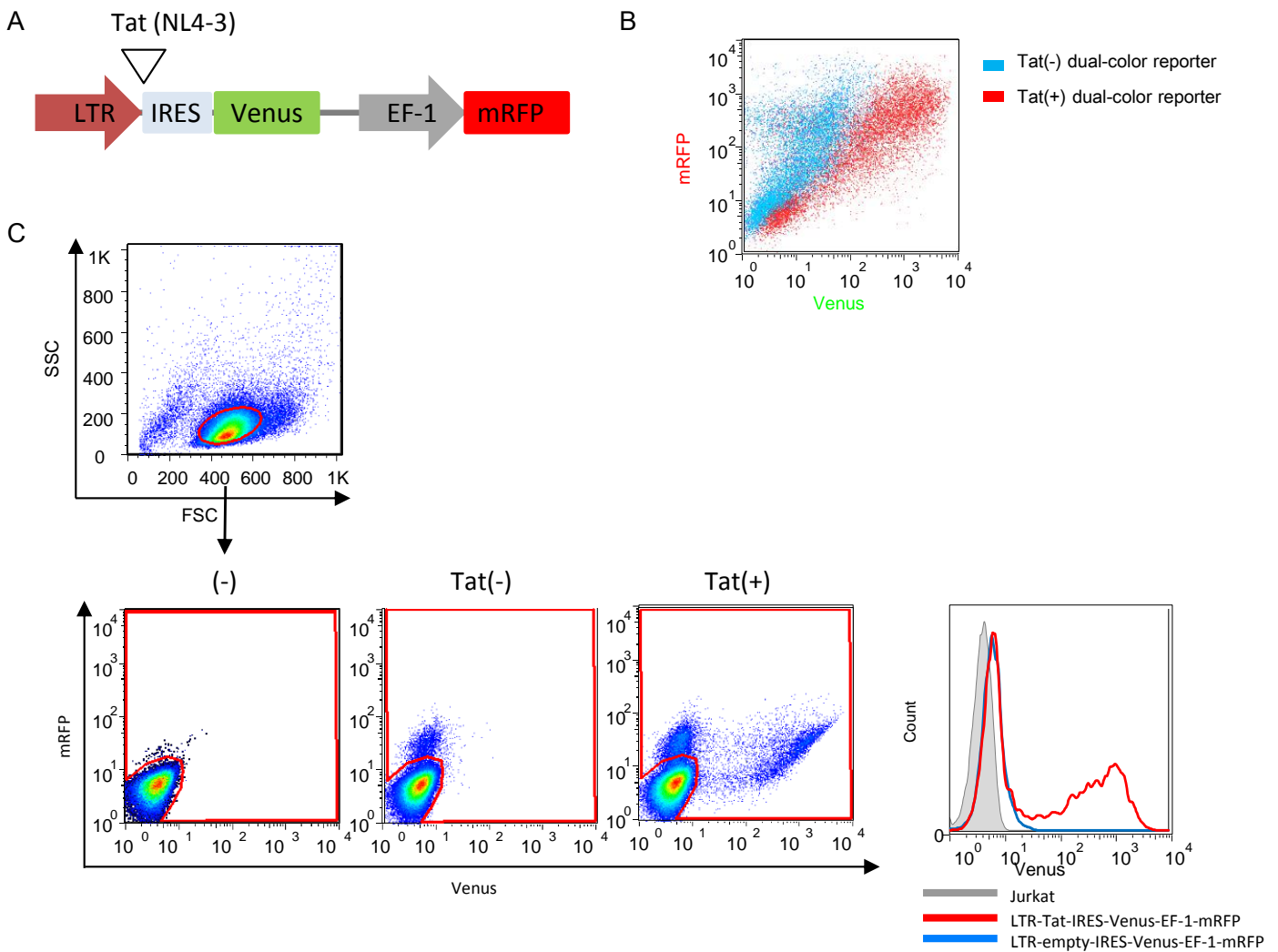


Fig.4 潜伏化モデル dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)の作製

(A)Dual color reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)のコンストラクト

(B)293T細胞での dual color reporterの一過的発現の解析

293T細胞にCS-LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP(Tat(-))とCS-LTR-empty-IRES-Venus-EF-1-mRFP(Tat(+))をリン酸カルシウム法によりトランスフェクションし、24時間後の蛍光タンパク質の発現をFlowcytometryにより解析した。青の散布図がTat(-),赤の散布図がTat(+),の dual color reporterトランスフェクションした293T細胞。

(C)Dual color reporter導入Jurkat細胞での安定的発現の解析

LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP(Tat(-))とLTR-empty-IRES-Venus-EF-1-mRFP(Tat(+))をレンチウイルスベクターによってJurkat細胞に安定的に導入し、導入72時間後の蛍光タンパク質の発現をFlowcytometry解析した。まずFSC,SSCで展開し、生細胞にゲートをかけた(上段散布図)。ゲートした細胞をmRFP,Venusで展開し、蛍光タンパク質の発現を観察した。Venusの発現はLTRの活性を、トレーサーの発現は導入細胞を示している(下段左から3つの散布図)。VenusまたはmRFPの少なくとも一色を発現している細胞をレポーター導入細胞とみなした。この導入細胞にゲートをかけて、Venusの発現強度を解析した(下段右のヒストグラム)。

Fig.5

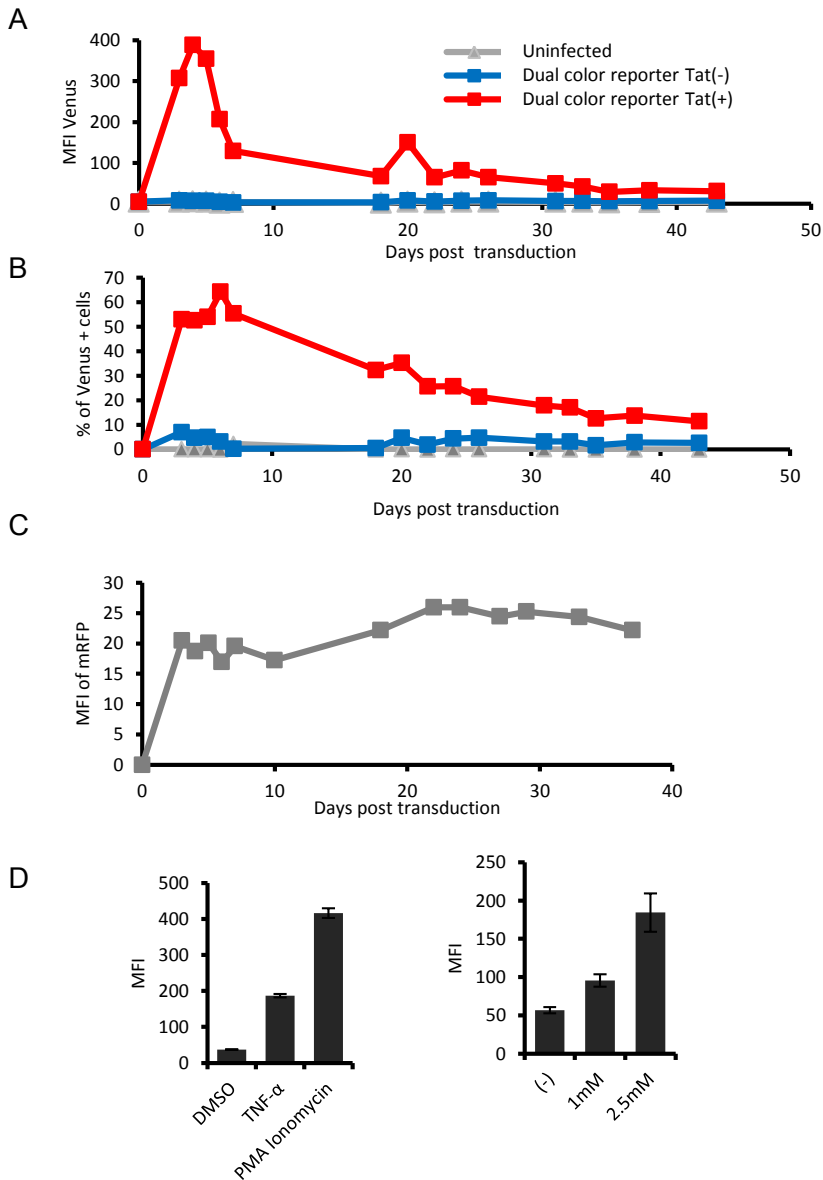
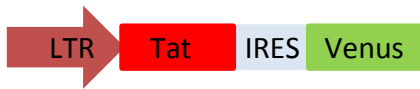


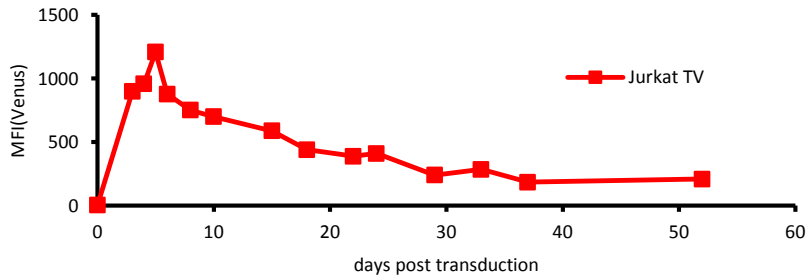
Fig. 5 dual color reporter reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)のHIV-1潜伏化モデルとしての検証  
 (A) Dual color reporter導入細胞でのLTR活性の経時変化(MFI)  
 レンチウイルスベクターによりレポーターを安定的に導入したJurkat細胞でLTRの活性強度の変化をVenusの蛍光強度の平均(MFI)として解析した。  
 (B) Dual color reporter導入細胞でのLTR活性の経時変化(% of Venus(+) cells)  
 レンチウイルスベクターによりレポーターを安定的に導入したJurkat細胞集団中でLTRの活性がある細胞の割合の変化をVenus(+)細胞の割合として解析した。  
 (C) Dual color reporter導入細胞でのEF-1 promoterの活性の経時変化(MFI)  
 レンチウイルスベクターによりレポーターを安定的に導入したJurkat細胞集団中で、EF-1プロモーターの活性の経時変化をmRFPの発現強度の平均として解析した。  
 (D) Dual color reporter導入細胞での潜伏化とLTR再活性化  
 Tat(+) dual color reporterを導入後60日目のJurkat細胞にPMA/Ionomycin(100ng/ml・1μM)を24時間処理、TNF-α(10ng/ml)を16時間処理し、LTRの活性の変化をVenusのMFIの変化として解析した。  
 (E) Dual color reporter導入細胞でのLTR抑制へのHDACの影響の解析  
 Tat(+) dual color reporterを導入後60日目のJurkat細胞にVPAを1mM,2.5mMの濃度で48時間処理し、LTRの活性の変化を解析した。

Fig.6

A



B



C

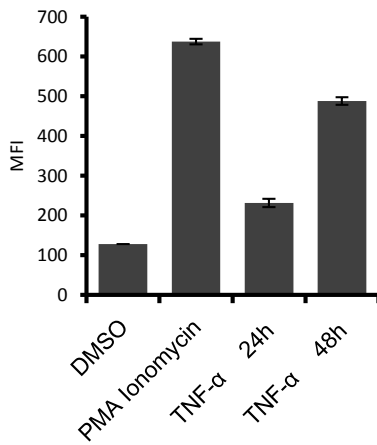


Fig. 6 dual color reporter reporter(LTR-Tat-IRES-Venus-EF-1-mRFP)のHIV-1潜伏化モデルとしての検証  
(A)Single color reporterのコンストラクト  
(B)Dual color reporter導入細胞でのLTR活性の経時変化(MFI)  
レンチウイルスベクターによりレポーターを安定的に導入したJurkat細胞でLTRの活性強度の変化をVenusの蛍光強度の平均(MFI)として解析した。  
(C) Single color reporter導入細胞での潜伏化とLTR再活性化  
Tat(+) dual color reporterを導入後60日目のJurkat細胞にPMA/Ionomycin(100ng/ml・1μM)を24時間処理、TNF-α(10ng/ml)を24時間、48時間時間処理し、LTRの活性の変化をVenusのMFIの変化として解析した。



Fig.7

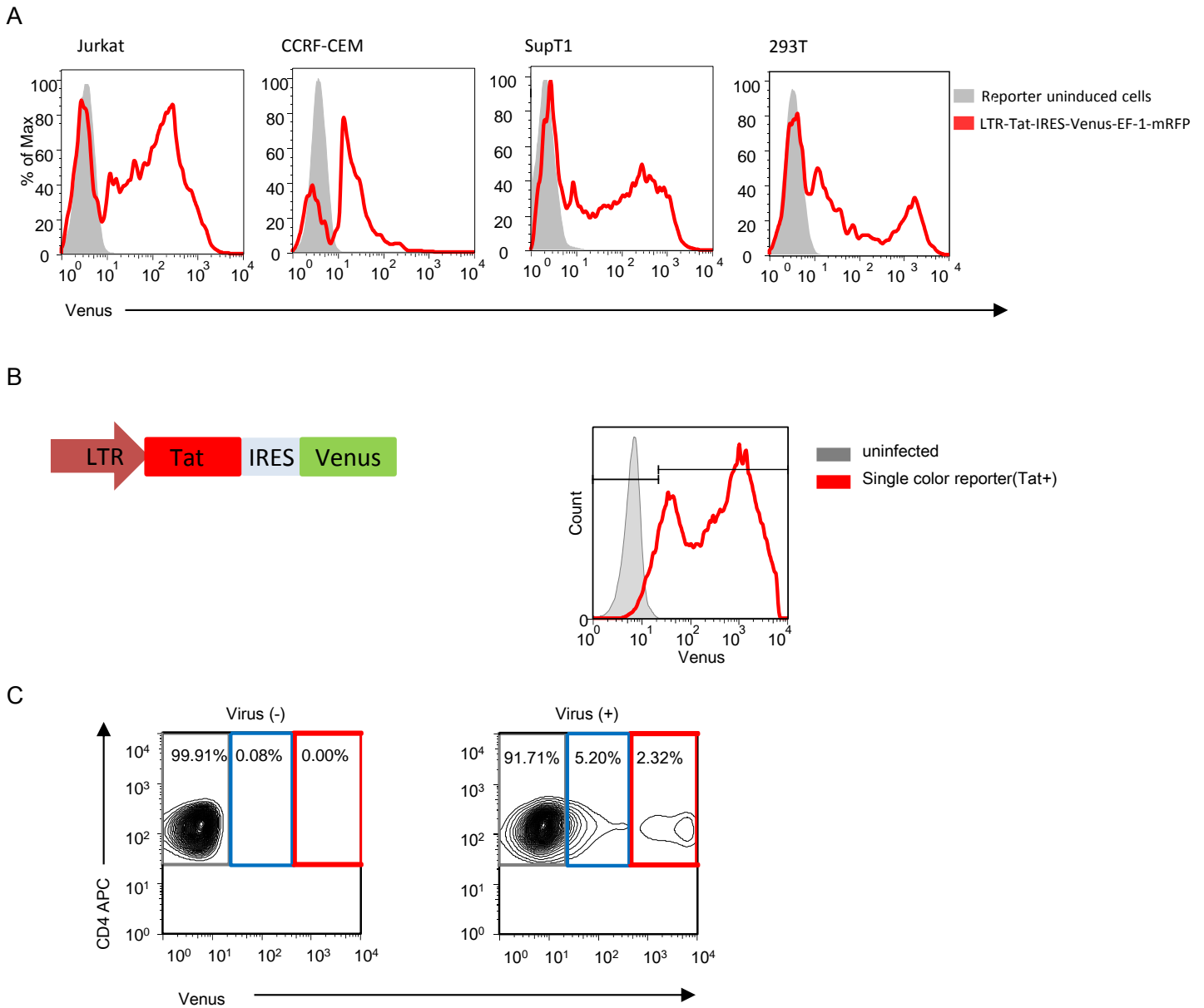


Fig. 7 dual color reporterを用いた感染初期のLTR活性の解析

(A)Dual color reporter導入細胞でのLTR活性の解析

Dual color reporterをT細胞株であるJurkat,CCRF-CEM,SupT1と上皮系の細胞株である293FTに導入し、導入後72時間後のレポーター導入細胞中のLTRの活性を解析した。

(B) Tatの感染初期のLTR活性への影響の解析

Tat(+)とTat(-)のレポーターを導入したJurkat細胞で、感染3日目のLTRの活性を比較した。

(C) Single color reporter導入細胞での感染初期のLTR活性解析

Single color reporterをJurkat細胞に導入し、感染後96時間のLTRの活性を集団全体で解析した。

(D)Single color reporter導入PBMCでの感染初期のLTR活性

健康人由来のPBMCをPHA(10ng/ml、48時間培養)により活性化し、single color reporterを導入した。CD4を免疫染色した後、Flowcytometry解析を行った。FSC,SSCで生細胞と見なした集団をゲートし、その集団中のCD4陽性細胞にVenusの発現を等高線で示した。等高線の間隔は2%で示している。

Fig.8

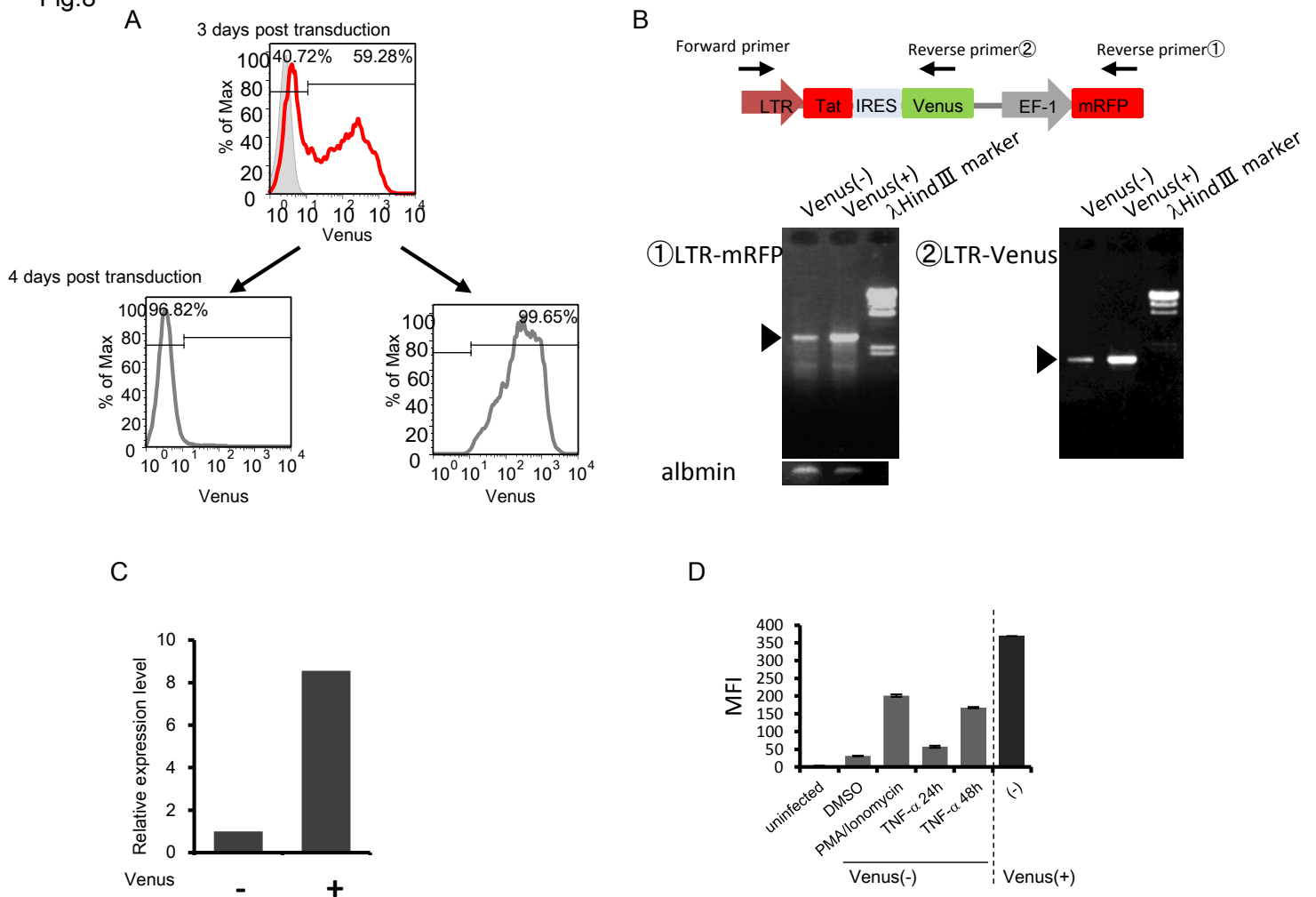


Fig. 8 感染初期のLTR抑制メカニズムの解析

(A) Dual color reporter 導入細胞の分取

Dual color reporter 導入4日目のJurkat細胞をFACS Aria cell sorterを用いて、Venusの強度ごとに分取した。分取1日後の解析では分取の精度は95%以上であった。

(B) Venus(-)集団でのプロウイルスの確認

分取したVenus(-)集団からgenomic DNAを抽出し、導入したレポーター配列の存在を確認した。上段の図はgDNA中に挿入したレポーター配列の検出用に設計したprimerの位置を示している。LTRのU3に設計したforward primerとmRFP上に設計したreverse primerを用いて、レポーターの全長を増幅した(上段左写真)。同じforward primerとVenus上に設計したreverse primerを用いて、LTRからVenusまでの配列を増幅した(上段右写真)。Albminをinternal controlとして解析した。

(C) Venus mRNA量の解析

Venus(-)とVenus(+)集団でのレポーターのRNA発現量をRT-PCRによって解析した。レポーターRNAの発現は、Venus領域に設計したprimer setを用いて解析し、b-actinによって補正した後、Venus(-)のRNA量を1とした相対値を示した。

(D) Venus(-)集団からのLTR活性の再活性化

Venus(-)集団をレポーター導入20日目においてPMA/Ionomycin(100ng/ml・1μM)24時間処理、TNF-α(10ng/ml)を24時間または48時間処理し、Flowcytometry解析し、LTRの活性の変化を調べた。

Fig.9

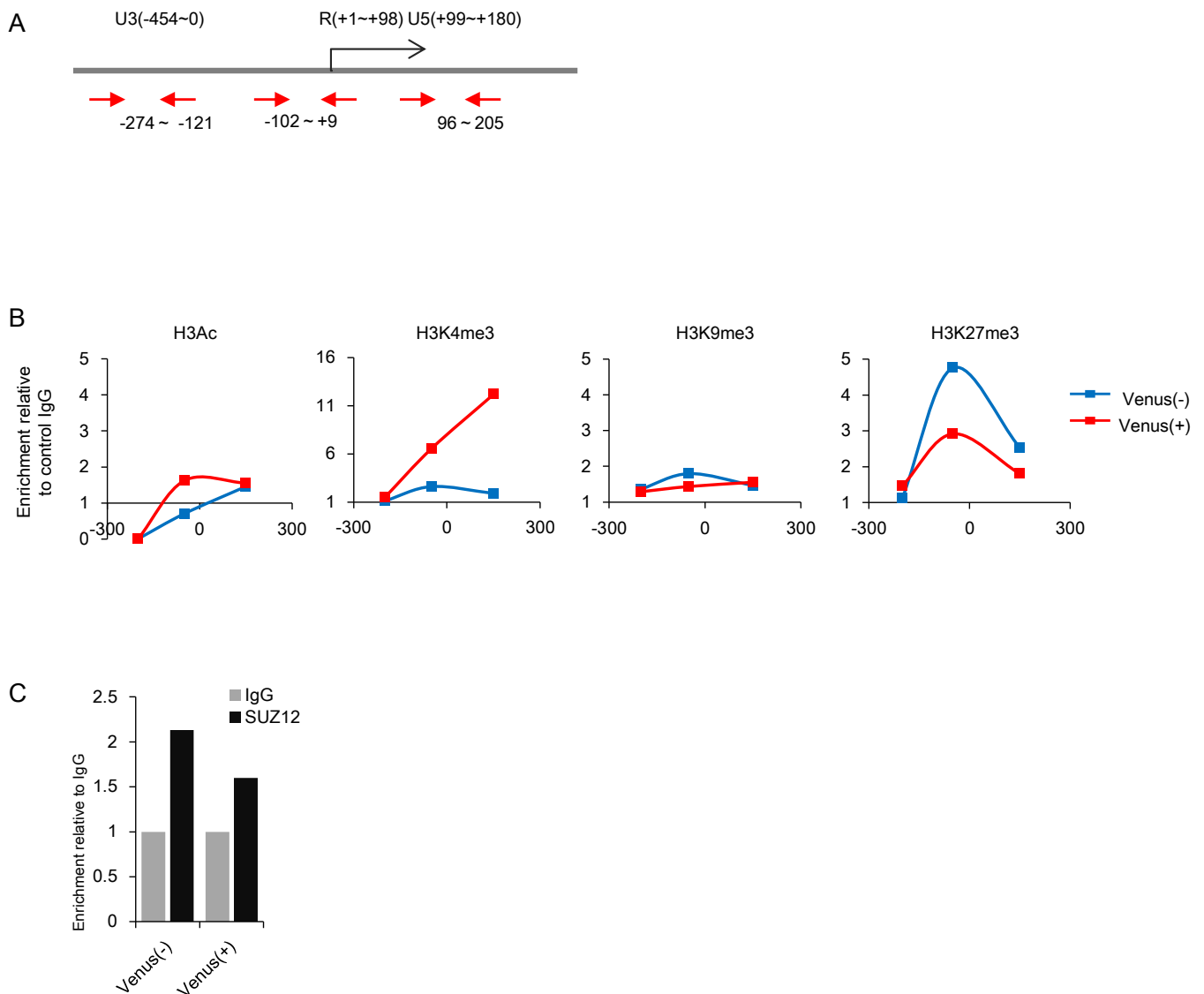


Fig. 9 感染初期のLTR抑制における宿主エピジェネティック制御の役割の解析

(A)ChIP assayのprimerの設計

レポーターのLTR特異的なChIP assay用のprimerを設計した。LTRのpromoterとしての活性に重要なTATA boxやNF-κB binding siteを含む領域、転写開始点以前、転写開始点以後にそれぞれprimer setを設計し、promoter,Nuc0,Nuc1と呼んだ。

(B) Venus(-)とVenus(+)間でのLTR上のヒストン修飾のレベルの比較

Venus(-)とVenus(+)集団のLTR上のヒストン修飾のレベルについてChIP assayにより解析した。Nuc0,promoter,Nuc1の3点についてそれぞれの修飾のレベルを解析し、2つの集団間で比較した。

(C)Promoter領域へのEZH2,SUZ12の局在の解析

LTRのpromoter領域におけるPRC2の主要因子であるEZH2とSUZ12の局在についてChIP assayを用いて解析し、Venus(-)集団とVenus(+)集団間で比較した。

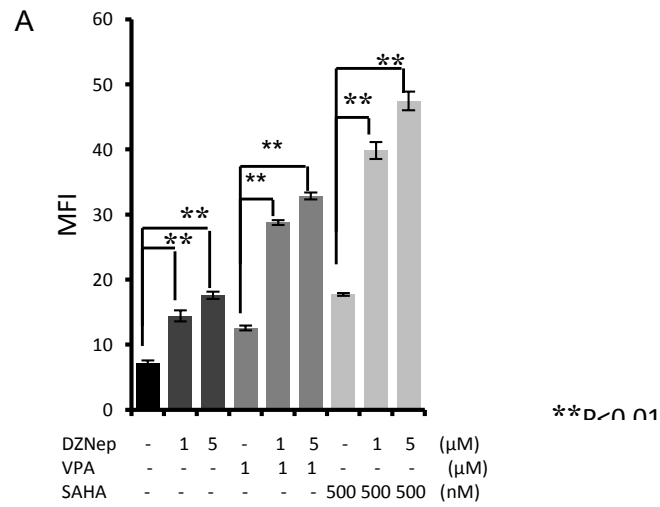


Fig. 10 Venus(-)集団でのPRC2のLTR活性への影響の解析

(A)PRC2阻害剤処理によるLTR再活性化の検討

レポーター導入20日目のVenus(-)集団にPRC2の阻害剤であるDZNep(1μM,5μM)で48時間処理し、Venusの蛍光強度の変化をFlowcytometry解析した。またHDAC阻害剤であるVPA(1mM), SAHA(500nM)の各単独処理とDZNepとの共処理後のLTRの活性化のレベルを比較した。(n=3,mean±SD)

Fig.11

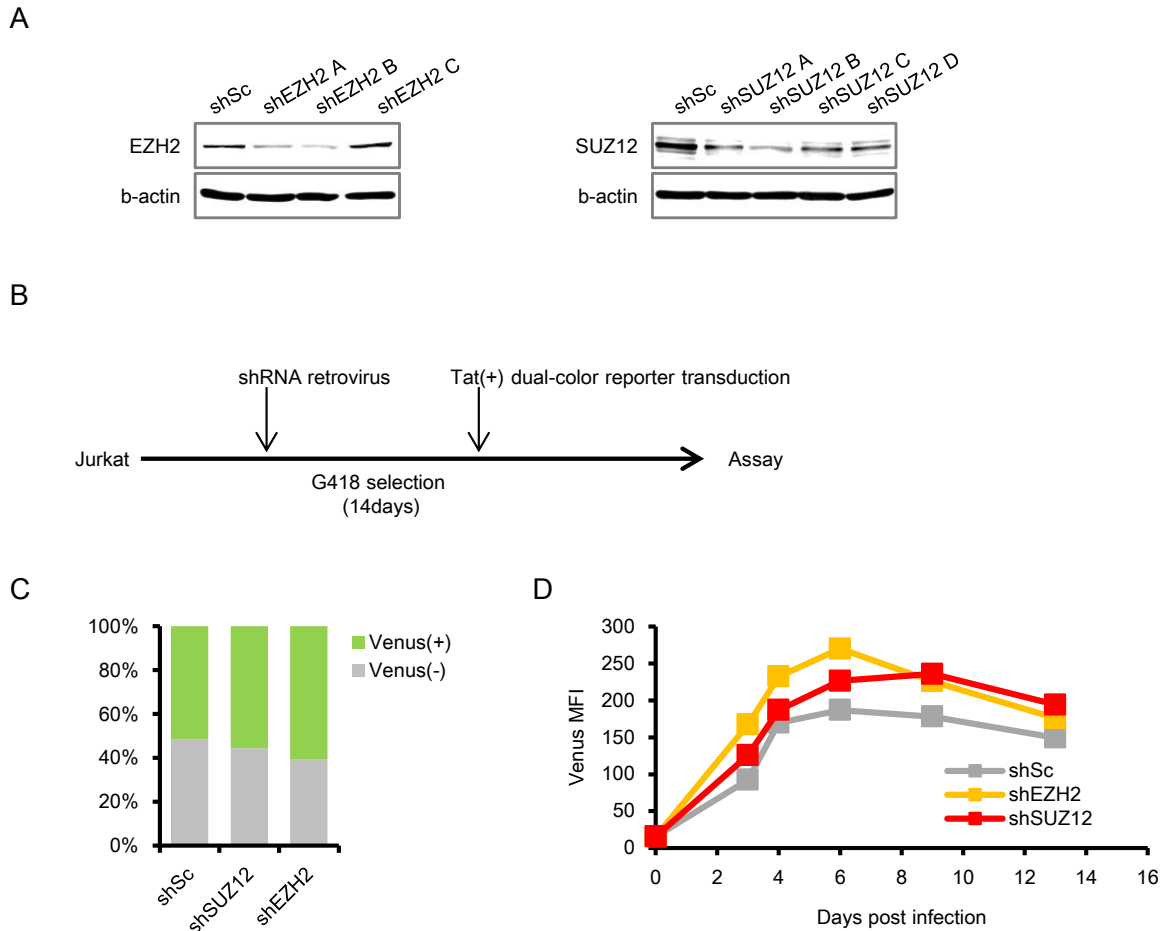


Fig. 11 感染初期のLTR活性抑制へのPRC2の影響の解析

(A)PRC2の主要構成因子EZH2,SUZ12のノックダウン

EZH2,SUZ12に特異的なshRNAをEZH2に対しては3種類、SUZ12に対しては4種類ずつ設計した。作製したshRNAをレンチウイルスベクターによりJurkat細胞に導入し、G418 selectionによってshRNA安定発現細胞株を樹立した。ノックダウン効率をウエスタンブロッティングにより確認した。EZH2ではshEZH2-A,-Bで最も高いノックダウン効率を確認された。SUZ12ではshSUZ12-A,-Bで最も高いノックダウン効率を確認された。

(B)PRC2ノックダウン細胞へのレポーター導入実験のスケジュール

Jurkat細胞にshRNA発現レトロウイルスベクターを導入し、導入24時間後からG418による選択を行った。G418選択開始14日目にG418を培養上清中から除き、レポーターを導入した。

(C)PRC2の感染初期のVenus(-)集団形成への影響

PRC2ノックダウン細胞にレポーターを導入し、導入細胞中のVenus(-)とVenus(+)集団の形成への影響を解析した。レポーター導入6日目のVenus(-)とVenus(+)集団の割合をshScrambleと比較した。

(D)感染初期のLTR活性へのPRC2の影響の解析

PRC2ノックダウン細胞にレポーターを導入し、導入3日目から16日目まで導入細胞全体でのLTRの活性の変化を導入細胞全体でのVenusのMFIとして解析した。

Fig.12

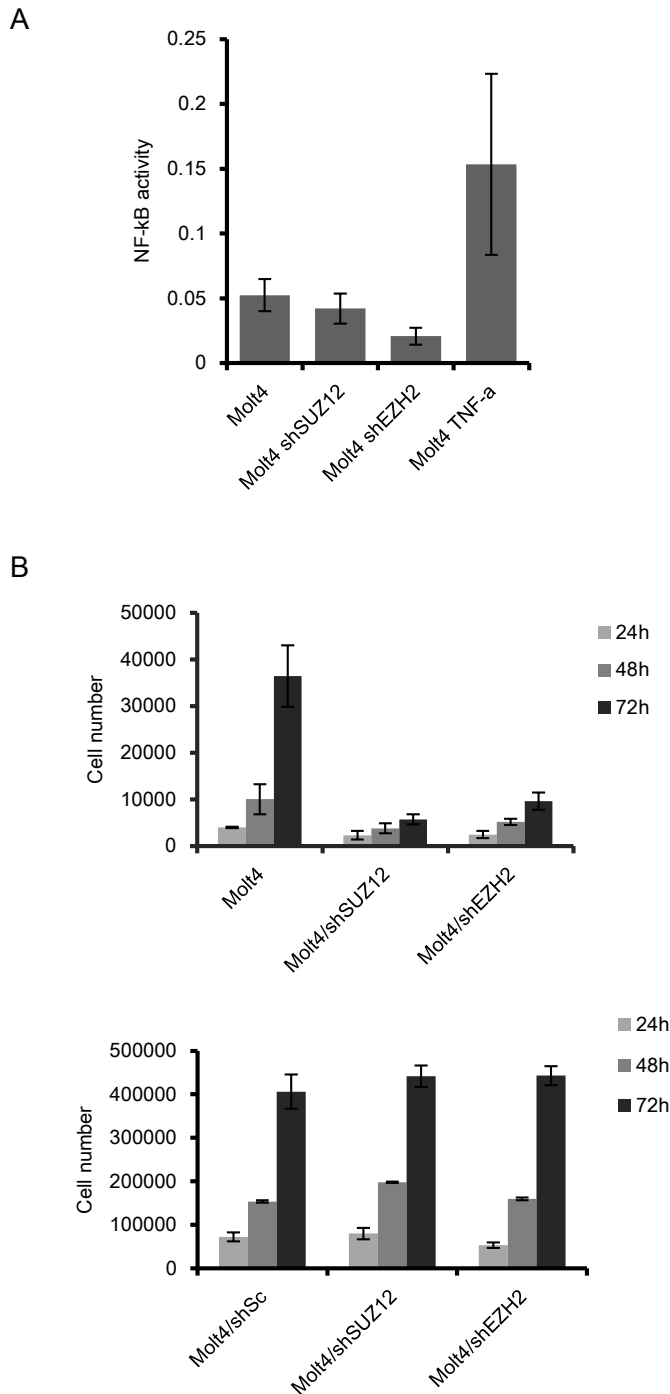


Fig. 12 PRC2ノックダウンの宿主への影響

(A)PRC2ノックダウンのNF-kB活性への影響の解析

樹立したshEZH2またはshSUZ12発現Molt4細胞に、6xkB luciferaseをトランスフェクションし、NF-kB活性へのPRC2のノックダウンの影響を解析した。TNF- $\alpha$ 処理はpositive control。(n=6,mean $\pm$ SD)

(B)PRC2ノックダウンの細胞増殖への影響の解析

shRNA発現Molt4細胞の増殖をG418選択開始後19日目と26日目においてMTT assayにより解析した。

(n=3,mean $\pm$ SD)

Fig.13

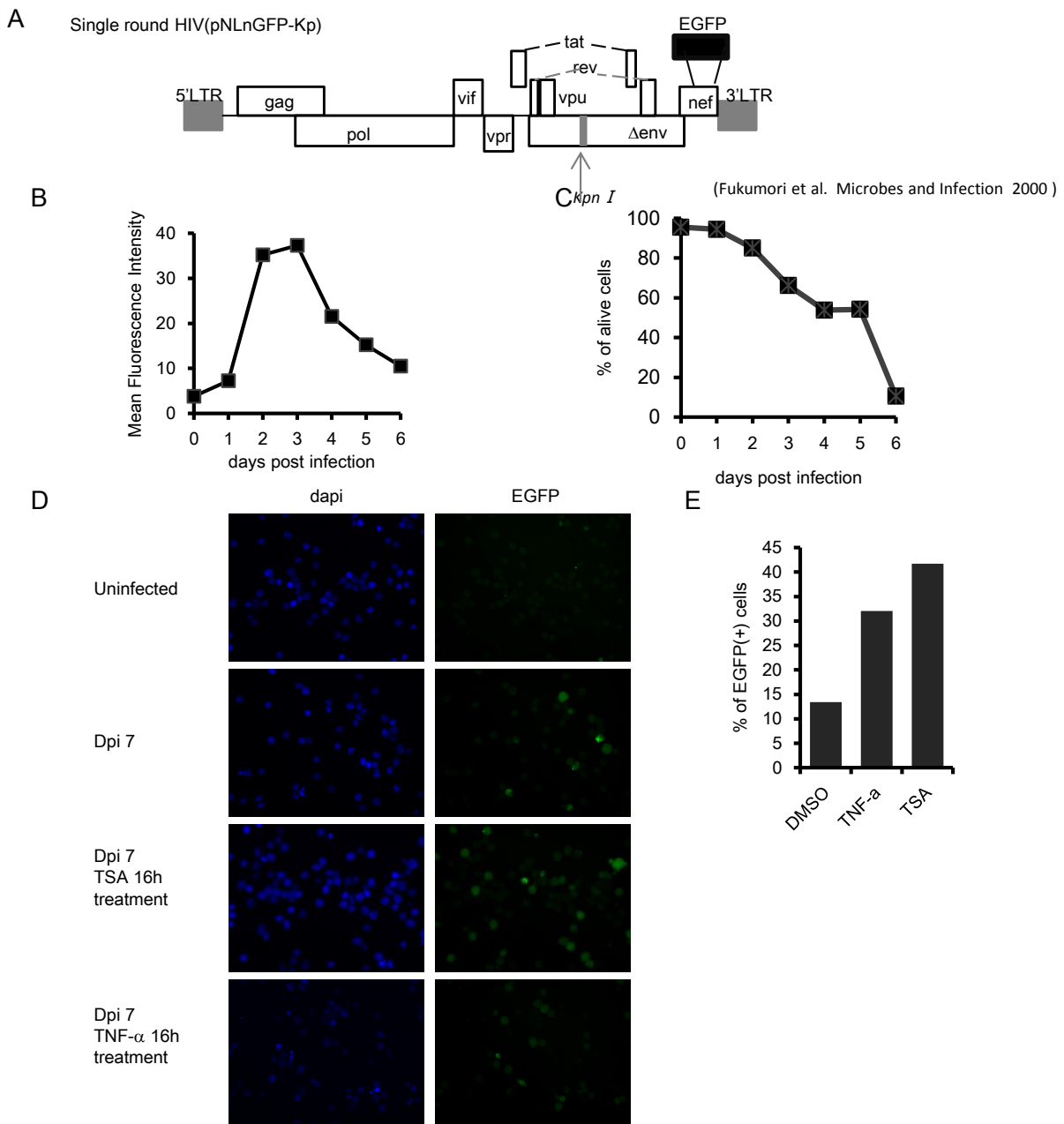


Fig. 13 single-round HIV感染系を用いた潜伏化モデルの作製

(A)single-round HIVのゲノム構造

Molecular clone pNLnGFP-Kpは徳島大学足立教授より供与していただいた。このウイルスはenvに欠損があり、複製可能なウイルスを産生しない。またNef領域にEGFPが挿入されている。このコンストラクトをVSV-Gでpseudotypeし、Molt4細胞に導入した。

(B)Single-round HIV感染Molt4細胞でのウイルス遺伝子の発現の解析

pNLnGFP-KpをVSV-Gでpseudotypeし、Molt4細胞に導入し、ウイルス遺伝子の発現をEGFPの発現としてlowcytometry解析により調べた。

(C)single-round HIV感染による細胞死の観察

Single-round HIV感染による生存への影響を感染Molt4集団のFSC,SSCのパターンの変化から簡易的に解析した。

(D)single-round HIV感染系での潜伏感染成立

Single round HIV感染7日目のMolt4細胞にTNF-α(10ng/ml)とTSA(500nM)16時間処理し、ウイルスの再活性化をEGFPの発現から解析した。EGFPの発現は、細胞はホルムアルデヒド固定した後、蛍光顕微鏡によって観察した。

(E)single-round HIV感染系を用いた潜伏感染細胞の再活性化

(D)と同じ細胞をFlowcytometryで解析し、EGFP発現量の変化を定量した。

Fig.14

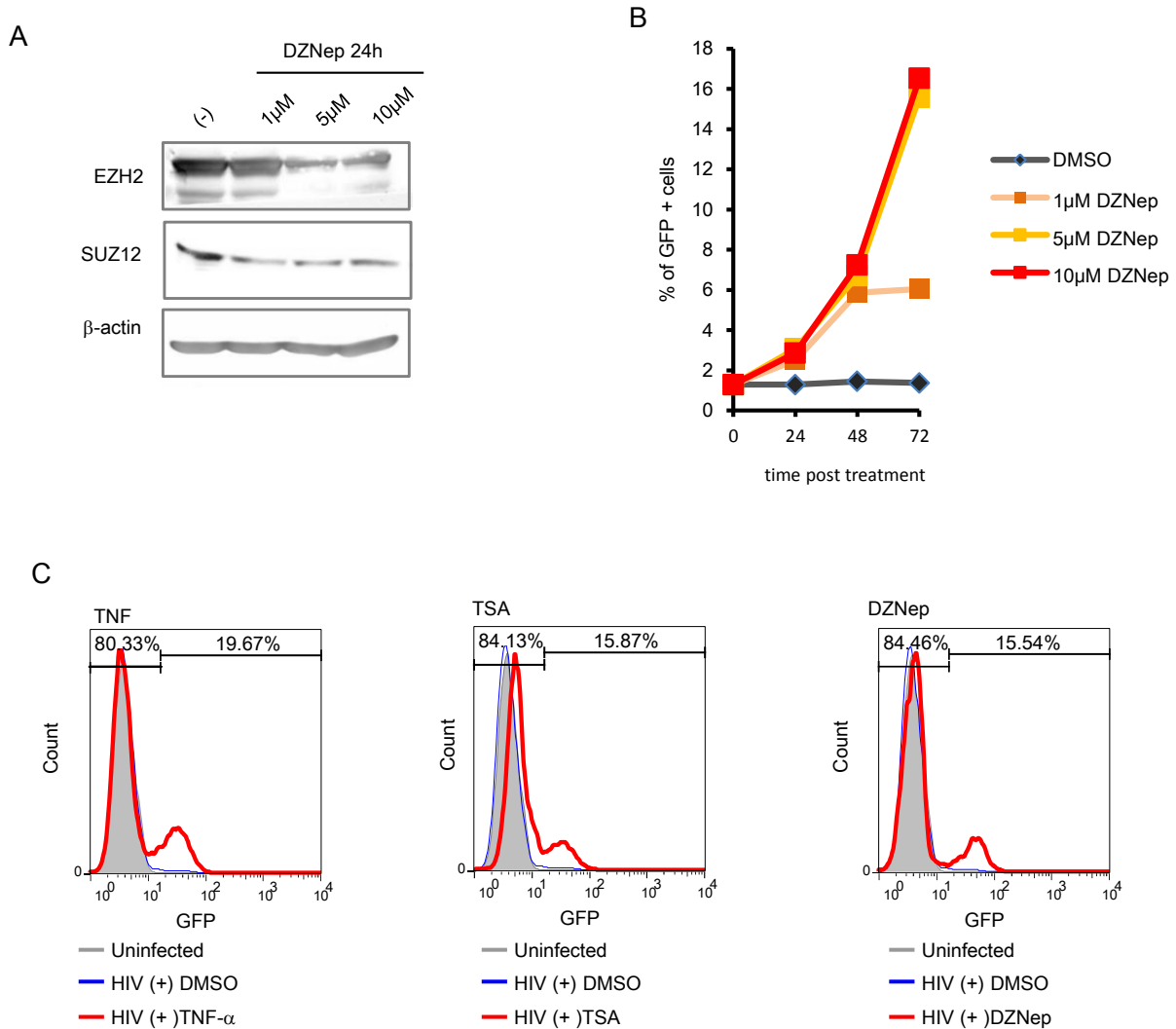


Fig. 14 single-round HIV潜伏感染モデルでのPRC2のLTRへの影響の解析

(A)DZNepの効果の検証

Molt4細胞にPRC2の阻害剤であるDZNepを1μM,5μM,10μMの濃度で処理し、24時間後にPRC2の主要構成因子EZH2,SUZ12のタンパク質のレベルをウエスタンブロットングで解析した。

(B)Single-round HIV潜伏感染Molt4細胞でDZNep処理によるウイルス遺伝子発現の再活性化

Single-round HIVを感染させ14日目のMolt4細胞にDZNepを1μM,5μM,10μMで処理し、24,48,72時間後にEGFPの発現レベルの変化をFlowcytometryで解析した。

(C)DZNepによる再活性化程度の比較

DZNep処理によってSingle-round HIV潜伏感染Molt4細胞から再活性化してくる細胞の割合をTNF-α処理、TSA処理による再活性化の場合と比較した。



Fig.15

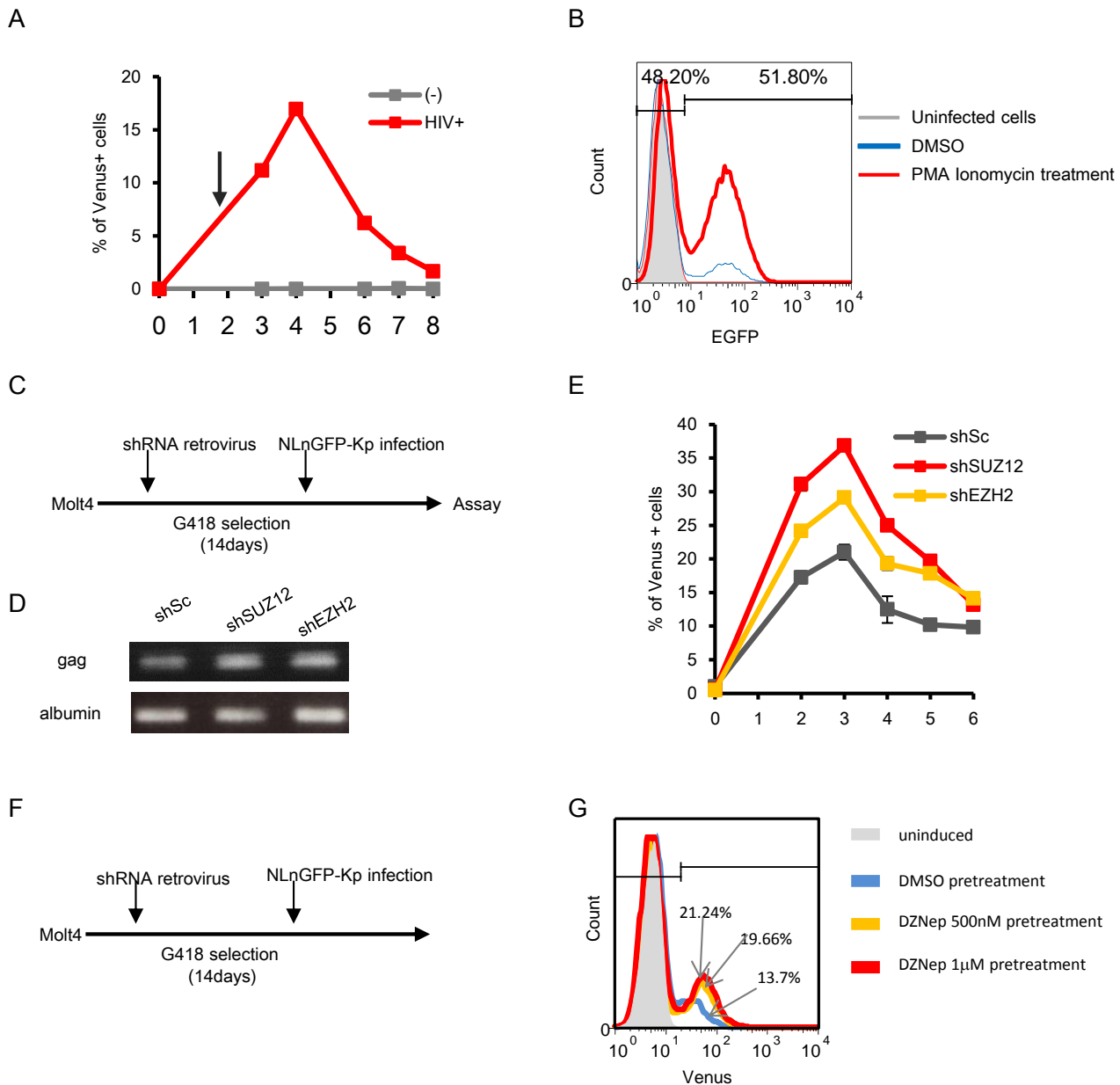


Fig. 15 single-round HIV感染系での感染初期のLTR活性の抑制とPRC2の影響解析

(A) Single-round HIV感染 CCRF-CEM細胞でのウイルス遺伝子の発現

Single-round HIVをCCRF-CEMに感染させ、EGFPの発現からウイルス遺伝子の発現を解析した。感染後2日目でLTRの再活性化刺激を行い、感染初期からLTRの活性が抑制された感染細胞が存在するか検証した。

(B) PMA/Ionomycin処理による潜伏感染細胞の活性化実験

Single-round HIV感染2日目でPMA/Ionomycin処理を行い、感染後4日目でウイルス遺伝子を発現している細胞の割合をFlowcytometry解析により調べた。

(C) PRC2ノックダウン細胞での感染初期のウイルス遺伝子発現の解析

樹立したEZH2またはSUZ12ノックダウンMolt4細胞にsingle-round HIVを感染させ、感染後2日目から6日目までのウイルス遺伝子発現の変化を解析した。

(D) PRC2ノックダウンによる感染効率への影響の解析

Single-round HIV感染2日目にEZH2またはSUZ12ノックダウンMolt4細胞からgenomic DNAを抽出し、感染効率をgag領域のPCRにより解析した。Internal controlとしてalbuminを用いた。

(E) PRC2阻害剤前処理による感染初期のウイルス遺伝子発現量への影響の解析

DZnepを比較的低濃度(500nM, 1µM)で48時間処理したJurkat細胞にsingle-round HIVを感染させ、感染後2日目のウイルス遺伝子発現細胞の割合を解析した。

Fig.16

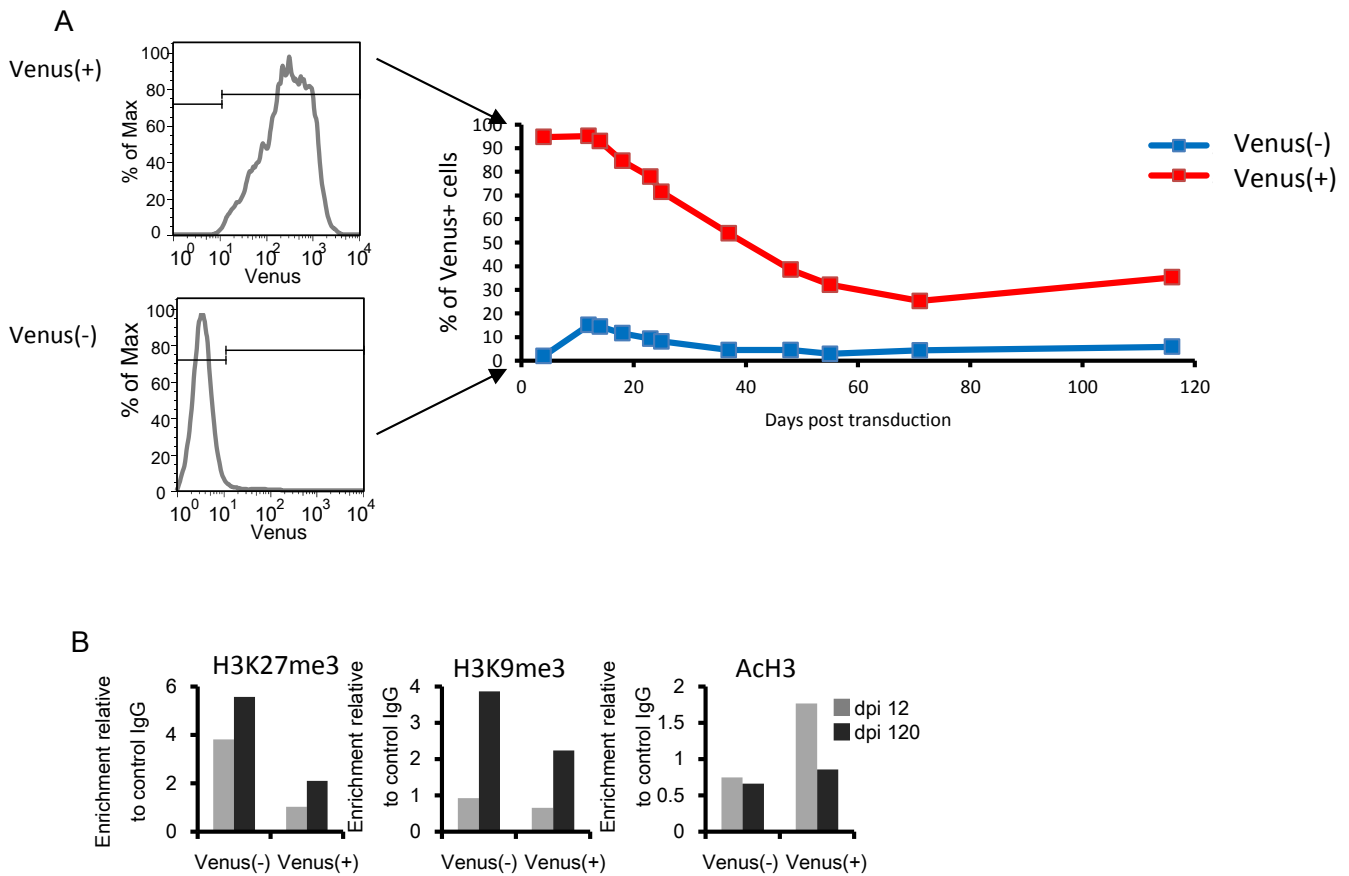


Fig. 16 dual color reporter導入系を用いたLTRの経時的な抑制メカニズムの解析

(A)Dual color reporter導入系を用いたLTR活性の経時変化の解析

感染4日目にVenusの強度によって分取したVenus(-)とVenus(+ )の集団を長期培養し、それぞれの集団でLTRの活性がどのように経時変化するか解析した。

(B)LTR活性の経時的な抑制と転写抑制的なヒストン修飾の蓄積

Venus(-),Venus(+ )集団についてレポーター導入12日目と120日目のLTR上のヒストン修飾のレベルの変化をChIP assayにより解析した。転写抑制的なヒストン修飾であるH3K27me3,H3K9me3レベルに注目し、LTR上のpromote領域での変化をcontrol IgGの値で補正した後、比較した。

Fig.17

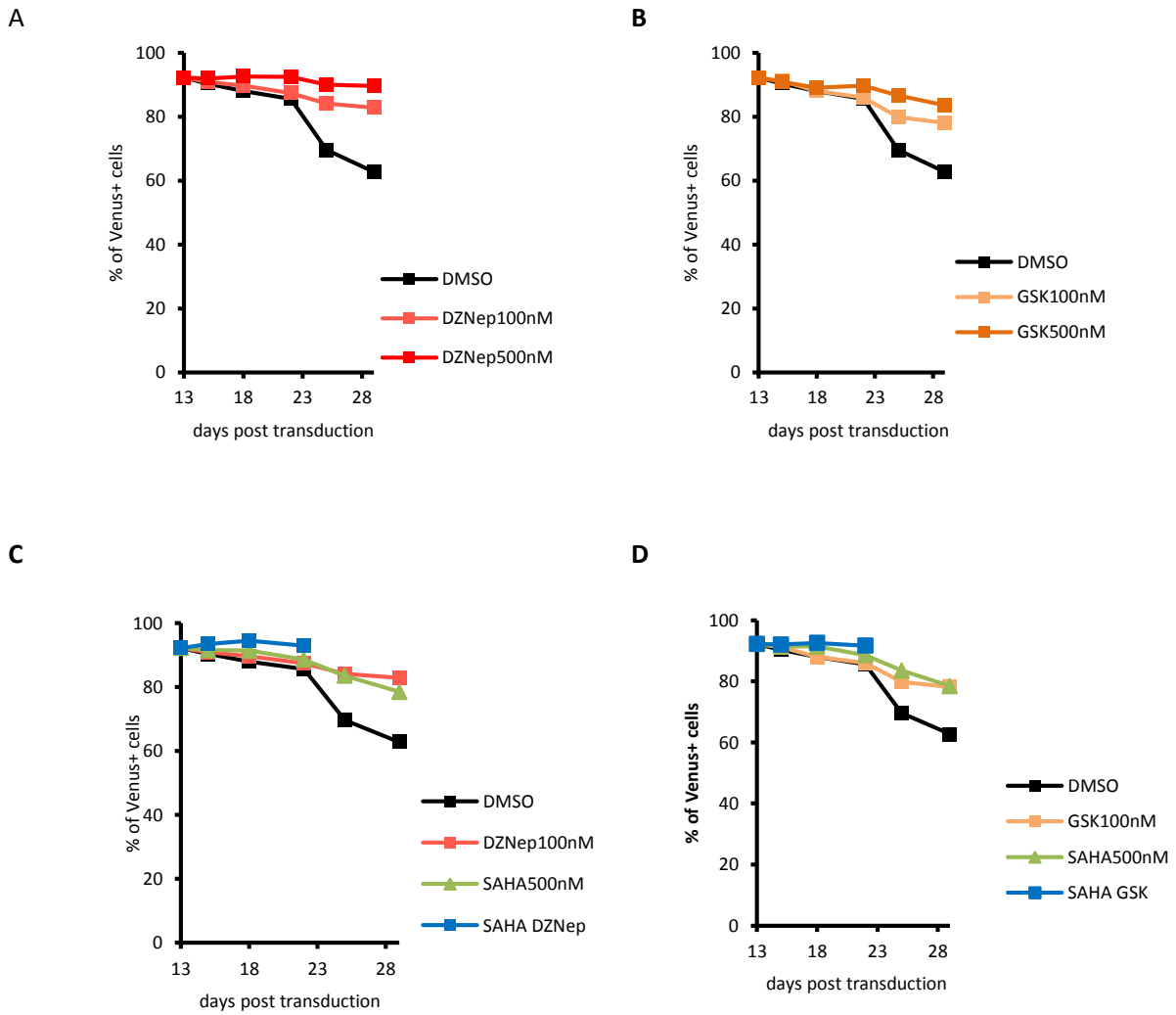


Fig. 17 LTR活性の経時的な抑制における宿主エピジェネティック制御因子の影響  
(A)DZNepの濃度依存的な潜伏化成立の阻害効果の検証  
(B)GSK126の濃度依存的な潜伏化成立の阻害効果の検証  
(C)DZNepとSAHAの共処理による潜伏化成立の阻害効果の検証  
(D)GSK126とSAHAの共処理による潜伏化成立の阻害効果の検証

Fig.18

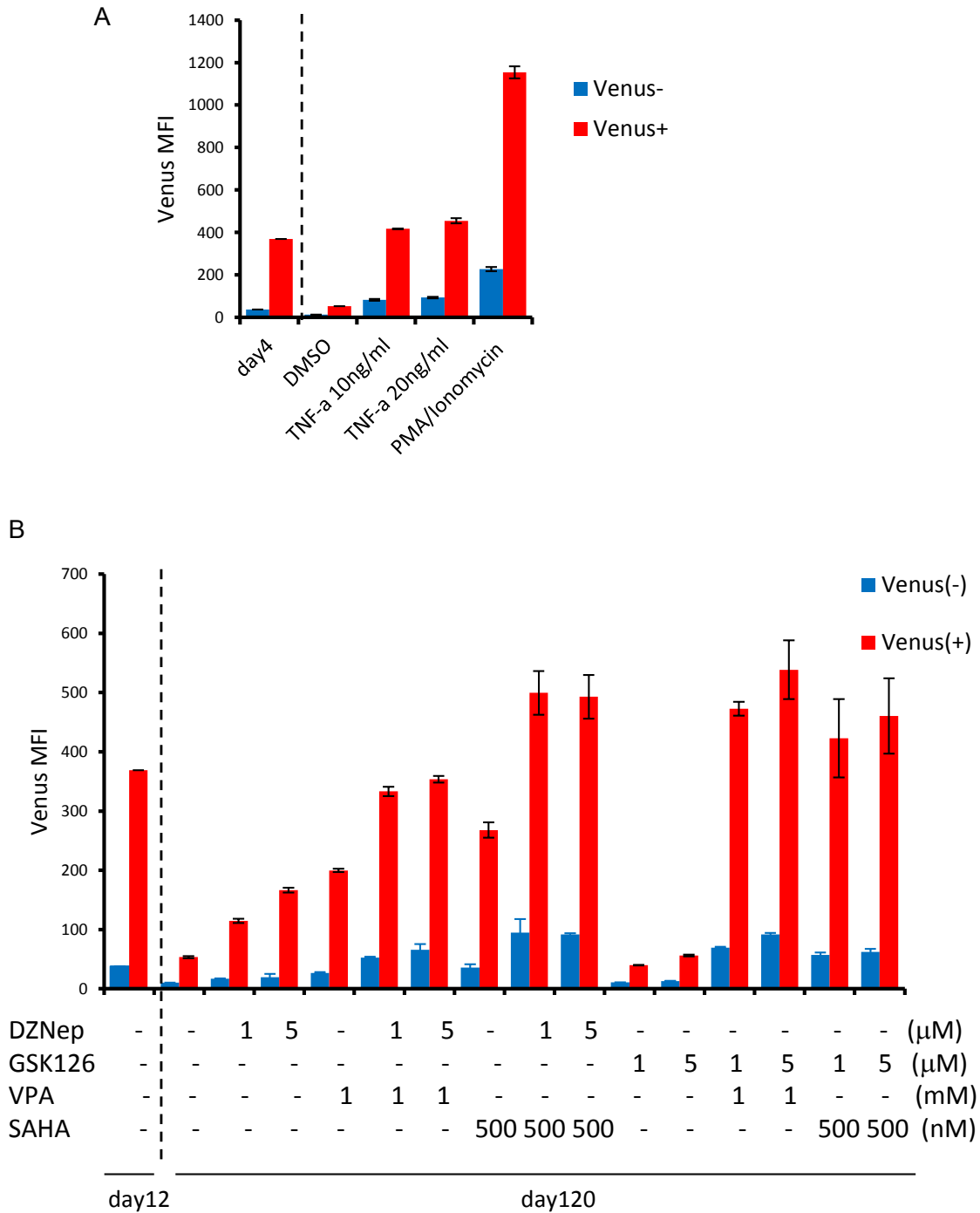


Fig. 18 潜伏化成立経路の違いによるLTRの応答性の違い

(A) Venus(-), Venus(+) 集団間の HIV 再活性化刺激に対する応答性の違い

レポーター導入後120日目の Venus(-), Venus(+) 集団について TNF- $\alpha$  (10ng/ml, 20ng/ml) または PMA/Ionomycin (100ng/ml  $\cdot$  1  $\mu$ M) 処理し、LTR の活性化のレベルを比較した。

(B) Venus(-), Venus(+) 集団間のエピジェネティック阻害剤に対する応答性の違い

レポーター導入後120日目の Venus(-), Venus(+) 集団について、DZNep (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M) を48時間、GSK126 (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M) を96時間処理し、LTR の活性化のレベルを比較した。また VPA (1mM), SAHA (500nM) を DZNep, GSK126 と共処理し、単独処理の効果との比較を行った。

Fig.19

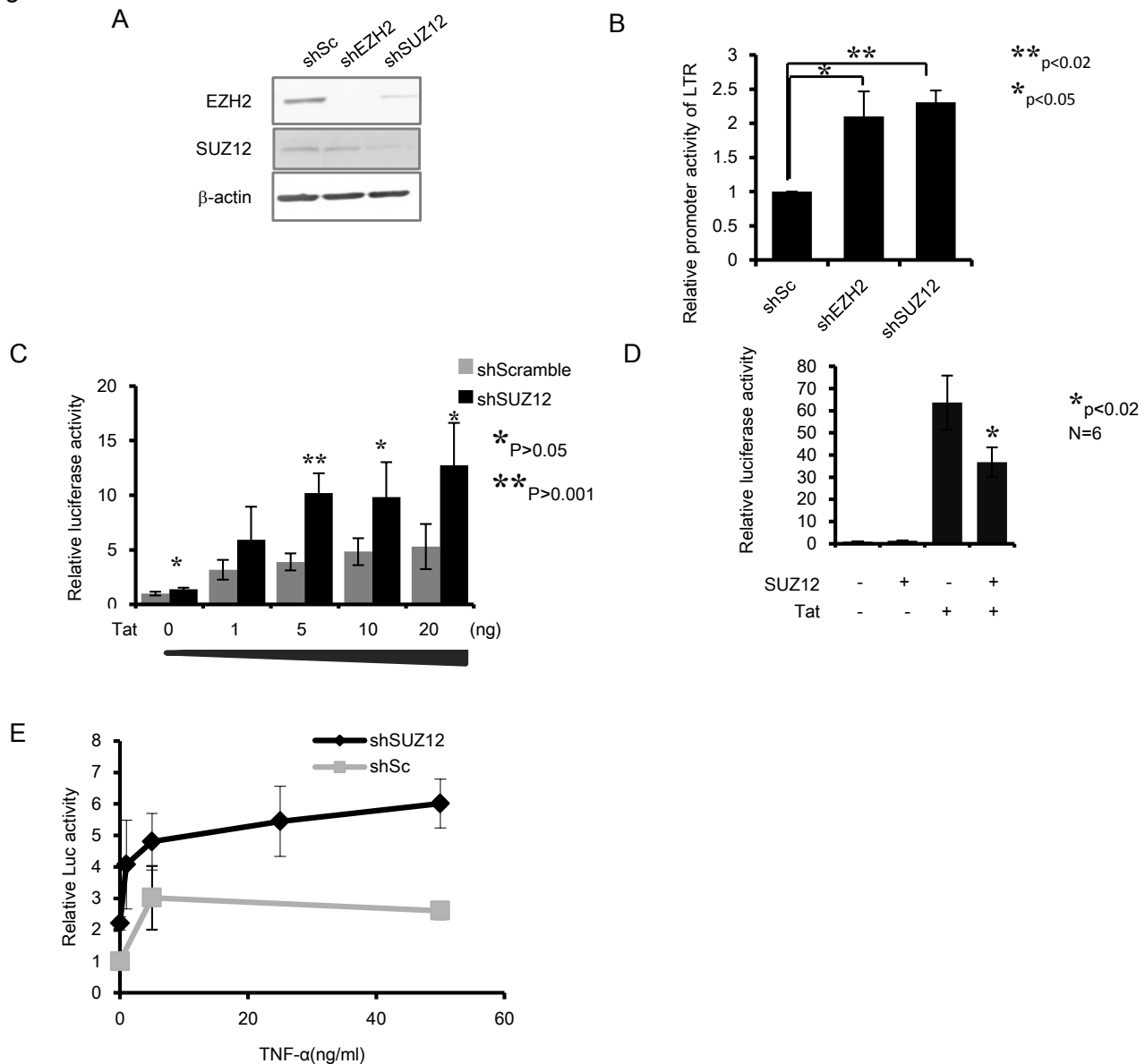


Fig. 19 潜伏化モデルHeLa/LTR-luciferaseを用いたTatのLTR活性化能へのPRC2の影響の解析

(A)PRC2ノックダウンHeLa/LTR-luciferaseの樹立

レトロウイルスベクターによりshEZH2またはshSUZ12発現配列を導入した。G418選択によって恒常的に発現する細胞株を樹立し、ノックダウンをウェスタンブロッティングにより確認した。

(B)HeLa/LTR-luciferaseでのPRC2のLTR抑制

EZH2,SUZ12をノックダウンしたHeLa/LTR-luciferase細胞でのLTRの活性をコントロールと比較した。

(n=6,mean $\pm$ SD)

(C)SUZ12ノックダウンのTatのLTR活性化能への影響の解析

SUZ12ノックダウン株とコントロール株にTatをトランスフェクションし、24時間後にLTRの活性化のレベルを比較した。(n=6,mean $\pm$ SD)

(D)SUZ12過剰発現のTatのLTR活性化能への影響の解析

HeLa/LTR-luciferase細胞にFlag-SUZ12発現ベクターとFlag-emptyベクターをそれぞれトランスフェクションし、48時間後にTatをトランスフェクションした。Tatをトランスフェクション後24時間でLTRの活性を解析し、SUZ12過剰発現細胞でのTatのLTR活性化能を解析した。

(E) SUZ12 ノックダウンによるTNF- $\alpha$ 刺激に対するLTRのプロモーター活性の変化

SUZ12ノックダウンしたHeLa/LTR-Luc細胞にTNF- $\alpha$ を5, 50ng/ml、15時間処理し、レポーターアッセイによってLTRのプロモーター活性の変化を調べた。グラフの縦軸はTNF- $\alpha$ 処理前のHeLa/LTR-Luc/shSc細胞のLuc活性の値で、他の条件で測定したLuc活性の値を補正したもの。

SUZ12 ノックダウン細胞ではTat存在下でのLTRの転写活性がScと比較して著しく増加している。

Fig.20

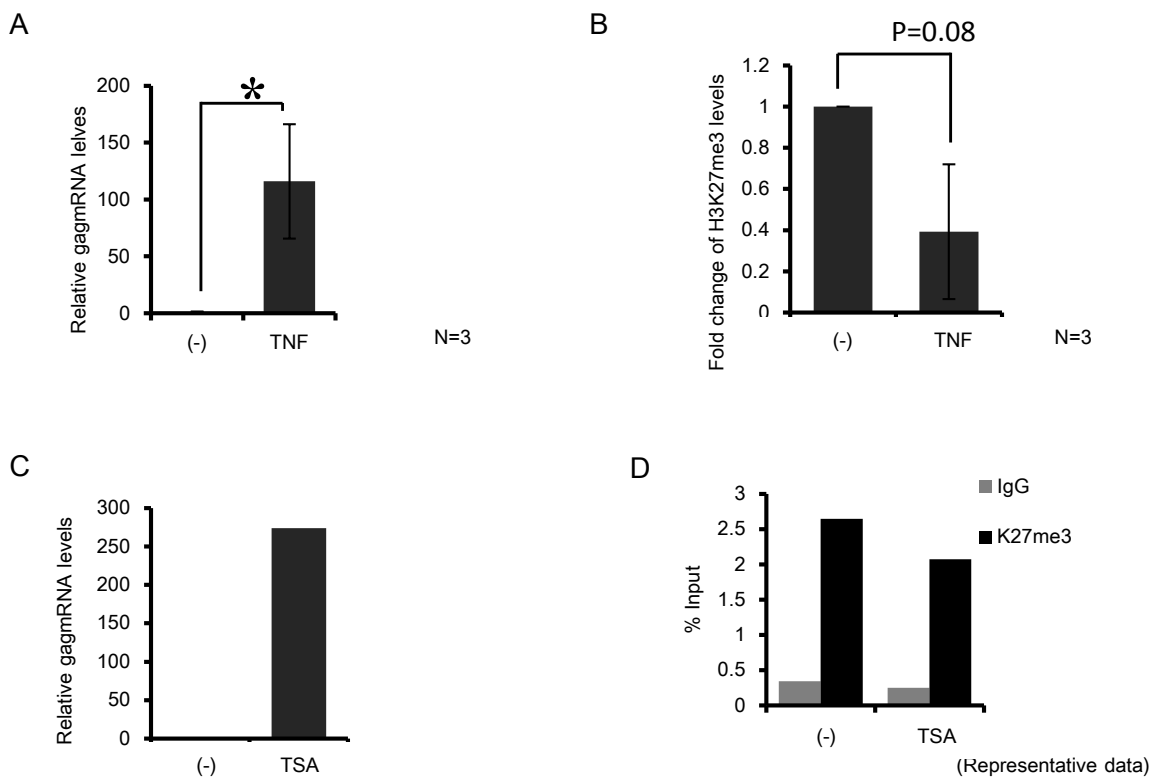


Fig. 20 HIV慢性感染細胞U1におけるウイルスRNA発現量とLTR上のH3K27me3レベルの関係

(A)TNF- $\alpha$ 処理によるウイルスRNA発現の活性化

U1細胞にTNF- $\alpha$ 処理(10ng/ml,16h)を行った後、RNAを採取した。ウイルスRNA量はRT-PCRによってgag領域の発現をreal-time PCRで定量し、b-actinの発現量で補正した。(n=3,mean $\pm$ SD)

(B) TNF- $\alpha$ 処理によるLTR上のH3K27me3レベルの変化

(A)と同様に処理したU1細胞でH3K27me3抗体を用いたChIP assayを行い、TNF- $\alpha$ 処理前後のLTR上のH3K27me3レベルの変化を調べた。ChIP assayの検出はLTRのpromoter領域に設計したprimer setを用いて行った。(n=3,mean $\pm$ SD)

(C) TSA処理によるウイルスRNA発現の活性化

U1細胞にTSA処理(500nM,16h)を行った後、RNAを採取した。ウイルスRNA量はRT-PCRによってgag領域の発現をreal-time PCRで定量し、b-actinの発現量で補正した。(n=2,mean)

(D)TSA処理によるLTR上のH3K27me3レベルの変化

(A)と同様に処理したU1細胞でH3K27me3抗体を用いたChIP assayを行い、TSA処理前後のLTR上のH3K27me3レベルの変化を調べた。ChIP assayの検出はLTRのpromoter領域に設計したprimer setを用いて行った。(representative data)

Fig.21

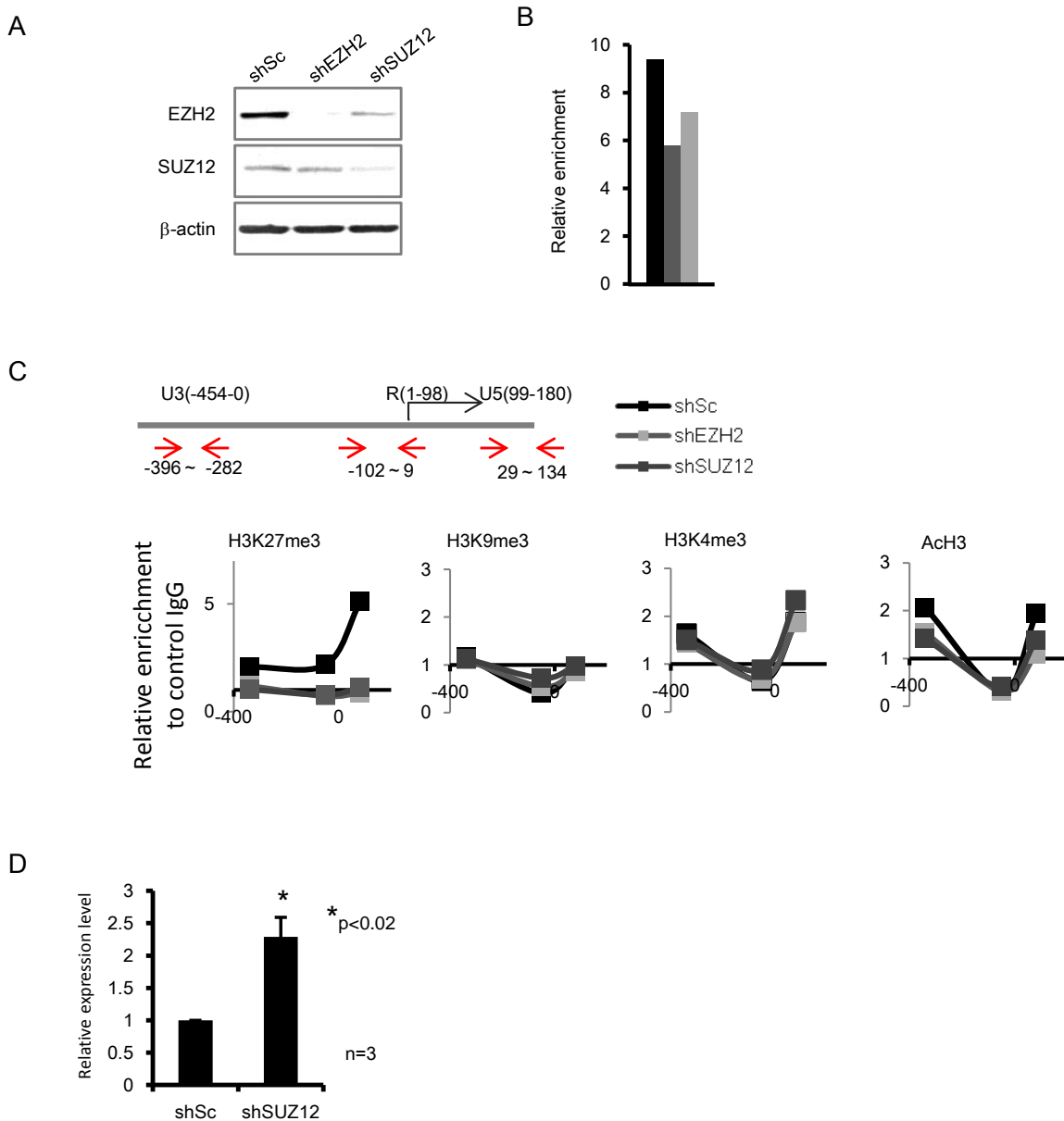


Fig. 21 HIV慢性感染細胞U1を用いたLTR上でのPRC2の影響の解析

(A)EZH2,SUZ12ノックダウンU1細胞の樹立

レトロウイルスベクターによりshEZH2またはshSUZ12発現配列を導入した。G418選択によって恒常的に発現する細胞株を樹立し、ノックダウンをウエスタンブロッティングにより確認した。

(B) EZH2,SUZ12ノックダウンによるMYT-1 promoter上のH3K27me3レベルの変化

樹立したEZH2,SUZ12ノックダウン細胞株でPRC2の標的領域であるMYT-1 promoter上のH3K27me3レベルの変化を解析した。H3K27me3の蓄積はcontrol IgGの値で補正した。

(C) EZH2,SUZ12ノックダウンによるLTR上の他のヒストン修飾のレベルの変化

樹立したEZH2,SUZ12ノックダウン細胞株でLTR上の転写制御に関与するヒストン修飾

(H3K27me3,H3K9me3, H3me3,Ach3)のレベルの変化を解析した。各ヒストン修飾のレベルはcontrol IgGで補正した。

(D)SUZ12ノックダウンによるウイルスRNAの発現レベルの変化

SUZ12ノックダウン細胞を樹立し、RNAを採取した。ウイルスRNA量はRT-PCRによってgag領域の発現をreal-time PCRで定量し、b-actinの発現量で補正した。(n=3,mean±SD)

Fig. 22

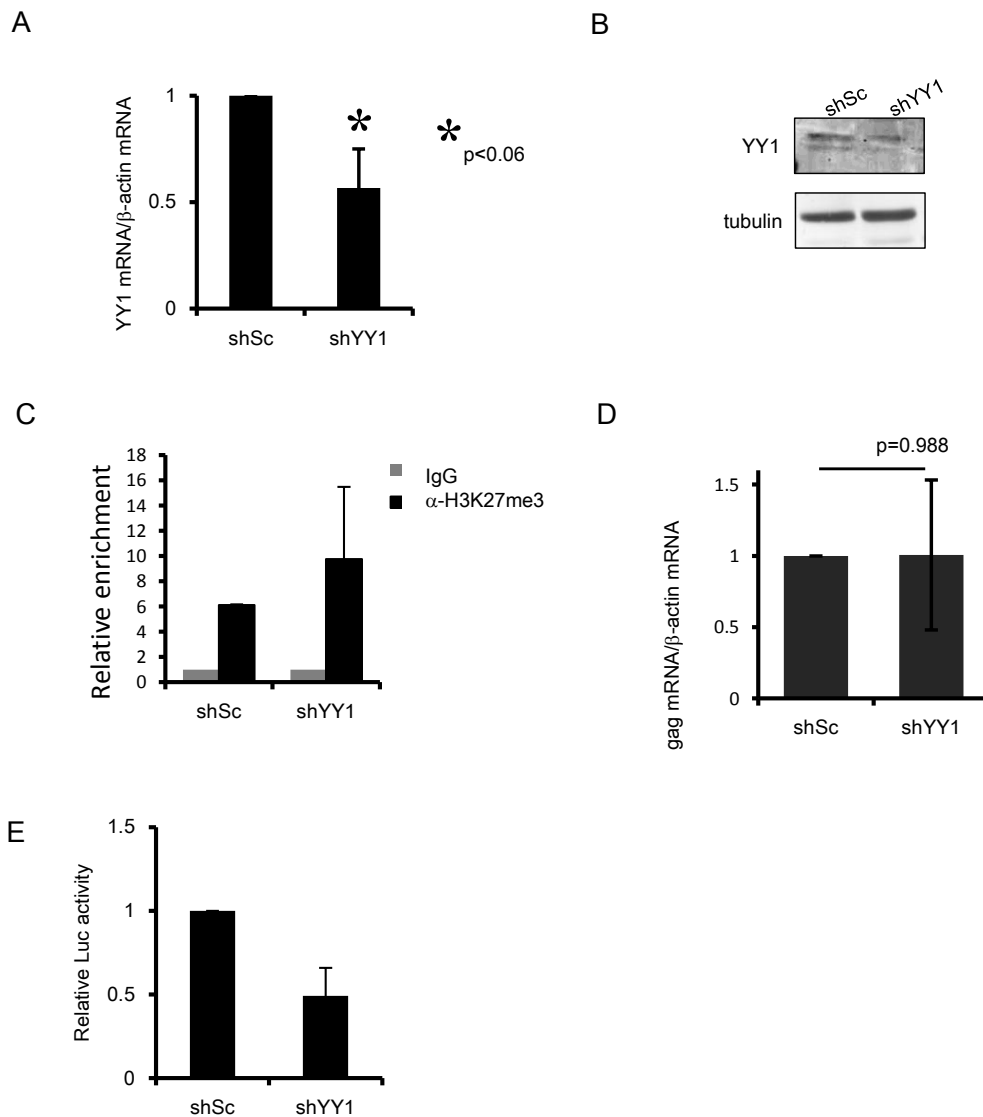


Fig.22 YY1のLTR上でのPRC2リクルーターの可能性の検証

(A)shYY1発現U1細胞でのRT-PCRによるYY1のmRNAレベルでのYY1ノックダウンの確認  
YY1 mRNA量はRT-real-time PCRで定量し、b-actinの発現量で補正した。(n=3,mean $\pm$ SD)

(B)Western blotting によるYY1のタンパク質レベルでのノックダウンの確認

(C)ChIP assayによるLTR上のH3K27me3レベルの比較

(D)RT-PCRによるウイルスRNA転写レベルの比較

shYY1発現株からRNAを採取し、ウイルスRNA量はRT-PCRによってgag領域の発現をreal-time PCRで定量し、b-actinの発現量で補正した。(n=3,mean $\pm$ SD)

(E)HeLa/LTR-luciferase細胞でのYY1ノックダウンのLTR活性への影響の解析



Fig.23

A

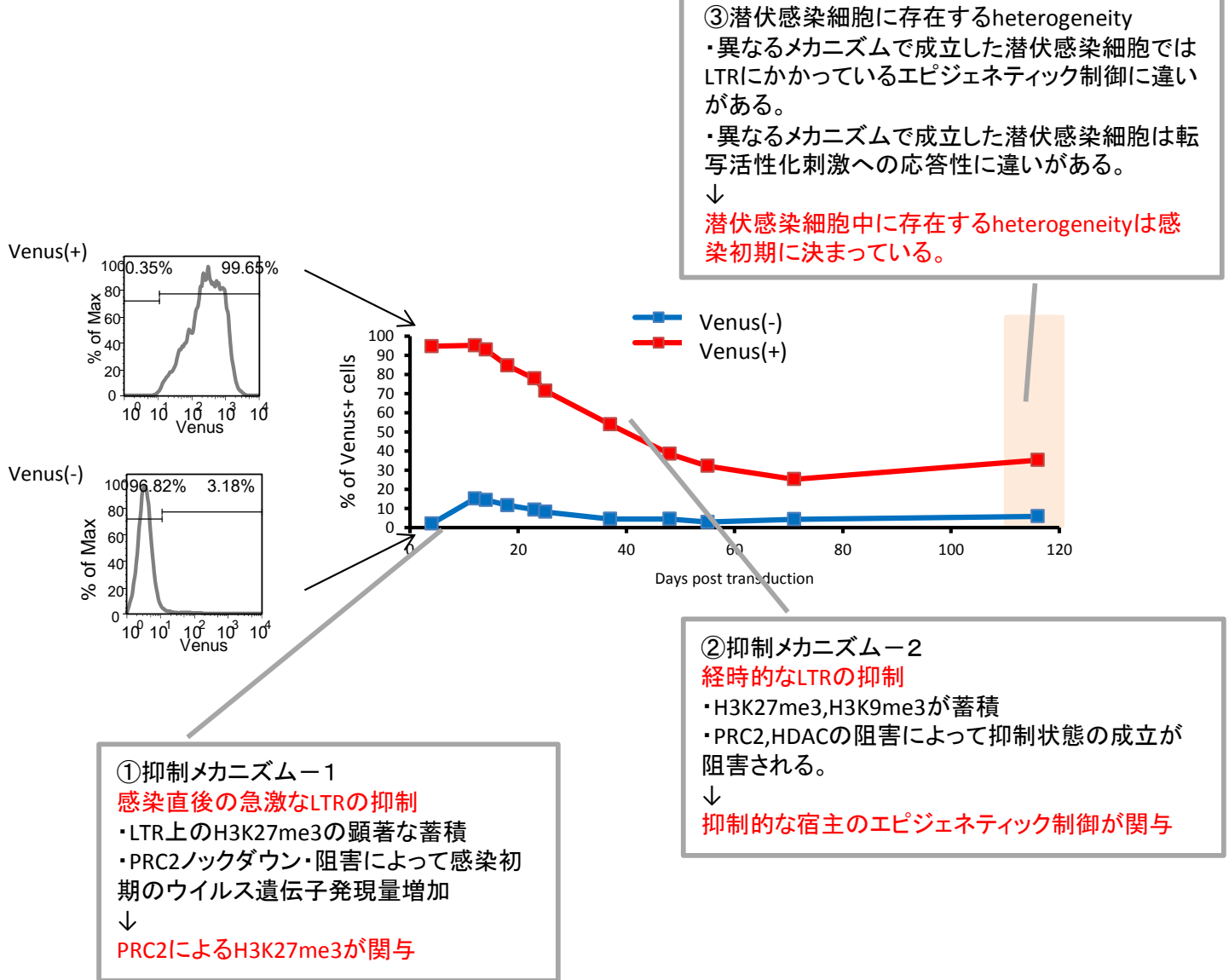


Fig.23 結果概念図 1

(A)潜伏化成立メカニズムについて

Dual color reporter導入系を用いて、潜伏化成立のメカニズムが感染直後の急激な抑制と経時的なLTR活性の抑制の2つの経路であることを明らかにした(①と②)。

またこれらの成立メカニズムの異なる潜伏感染細胞ではLTR上にかかっているエピジェネティック制御が異なり、再活性化刺激やエピジェネティック因子阻害薬への応答性も異なることが明らかとなった。

Fig.24

A

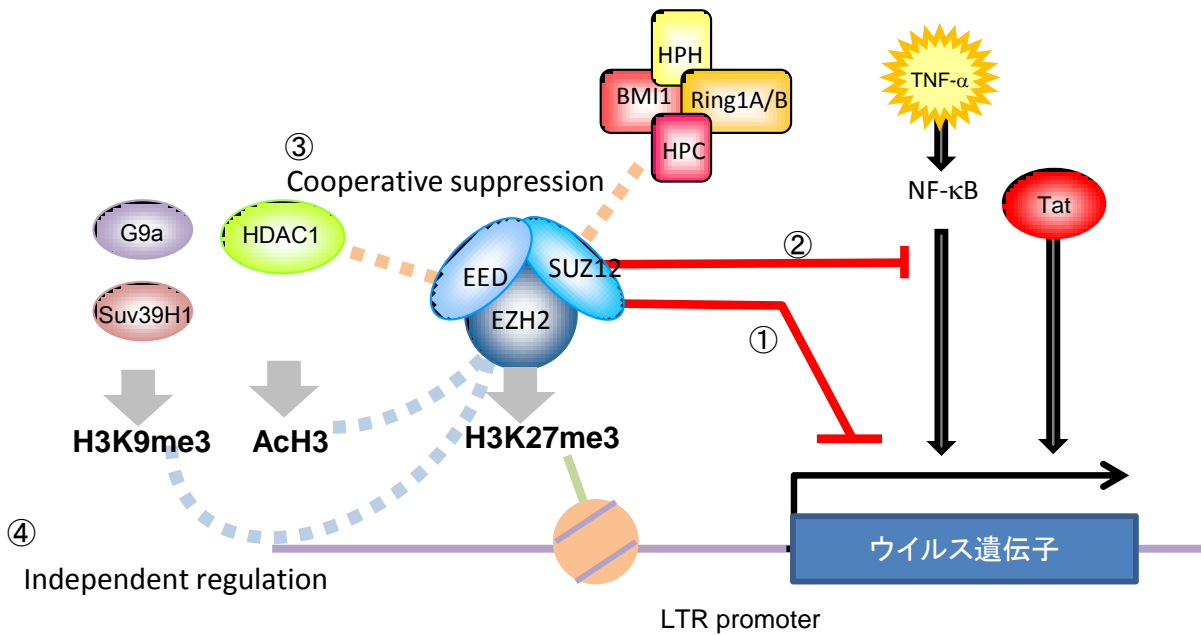


Fig.24 結果概念図 2

(A) LTR上でのPRC2の抑制機構と影響について

本研究からPRC2がH3K27me3修飾を介して、LTRのプロモーター活性を抑制し、ウイルス遺伝子の発現を抑制していることが示唆された(①)。またPRC2による抑制はTatによるLTR活性化を阻害することが明らかとなった。またTNF- $\alpha$ 処理によるNF- $\kappa$ B活性化によるLTR活性化も阻害することが明らかとなった。この結果から、PRC2による抑制は定常状態だけでなく、LTRの活性化因子による転写活性化も阻害することが示唆された(②)。

またPRC2とHDAC1による制御は協調してLTRの抑制に寄与していることが明らかとなった(③)。しかしPRC2のノックダウンし、H3K27me3のレベルを変化させても他のヒストン修飾のレベルには影響がなかった。これらの結果から、PRC2は他のエピジェネティック制御因子と協調してLTRの抑制に働く一方で他のヒストン修飾のレベルの制御とは独立であることが示唆された。

## 参考文献

Archin, N.M., Liberty, A.L., Kashuba, A.D., Choudhary, S.K., Kuruc, J.D., Crooks, A.M., Parker, D.C., Anderson, E.M., Kearney, M.F., Strain, M.C., *et al.* (2012).

Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 487, 482-485.

Bailey, J.R., Sedaghat, A.R., Kieffer, T., Brennan, T., Lee, P.K., Wind-Rotolo, M., Haggerty, C.M., Kamireddi, A.R., Liu, Y., Lee, J., *et al.* (2006). Residual human immunodeficiency virus type 1 viremia in some patients on antiretroviral therapy is dominated by a small number of invariant clones rarely found in circulating CD4+ T cells. *J. Virol.* 80, 6441-6457.

Bernhard, W., Barreto, K., Raithatha, S., and Sadowski, I. (2013). An upstream YY1 binding site on the HIV-1 LTR contributes to latent infection. *PLoS One* 8, e77052.

Blazkova, J., Trejbalova, K., Gondois-Rey, F., Halfon, P., Philibert, P., Guiguen, A., Verdin, E., Olive, D., Van Lint, C., Hejnar, J., and Hirsch, I. (2009). CpG methylation controls reactivation of HIV from latency. *PLoS Pathog.* 5, e1000554.

Bolden, J.E., Peart, M.J., and Johnstone, R.W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 769-784.

Bosque, A., Famiglietti, M., Weyrich, A.S., Goulston, C., and Planelles, V. (2011). Homeostatic proliferation fails to efficiently reactivate HIV-1 latently infected central memory CD4+ T cells. *PLoS Pathog.* 7, e1002288.

Bracken, A.P., Pasini, D., Capra, M., Prosperini, E., Colli, E., and Helin, K. (2003). EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo j.* 22, 5323-5335.

Brady, T., Agosto, L.M., Malani, N., Berry, C.C., O'Doherty, U., and Bushman, F. (2009). HIV integration site distributions in resting and activated CD4+ T cells infected in culture. *Aids* *23*, 1461-1471.

Bres, V., Yoshida, T., Pickle, L., and Jones, K.A. (2009). SKIP interacts with c-Myc and Menin to promote HIV-1 Tat transactivation. *Mol. Cell* *36*, 75-87.

Burnett, J.C., Miller-Jensen, K., Shah, P.S., Arkin, A.P., and Schaffer, D.V. (2009). Control of stochastic gene expression by host factors at the HIV promoter. *PLoS Pathog.* *5*, e1000260.

Calvanese, V., Chavez, L., Laurent, T., Ding, S., and Verdin, E. (2013). Dual-color HIV reporters trace a population of latently infected cells and enable their purification. *Virology* *446*, 283-292.

Caron, C., Boyault, C., and Khochbin, S. (2005). Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays* *27*, 408-415.

Carter, C.C., Onafuwa-Nuga, A., McNamara, L.A., Riddell, J., 4th, Bixby, D., Savona, M.R., and Collins, K.L. (2010). HIV-1 infects multipotent progenitor cells causing cell death and establishing latent cellular reservoirs. *Nat. Med.* *16*, 446-451.

Chomont, N., El-Far, M., Ancuta, P., Trautmann, L., Procopio, F.A., Yassine-Diab, B., Boucher, G., Boulassel, M.R., Ghattas, G., Brenchley, J.M., *et al.* (2009). HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat. Med.* *15*, 893-900.

Chun, T.W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., DiGiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., *et al.* (1997).

Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* *387*, 183-188.

Chun, T.W., Davey, R.T., Jr, Engel, D., Lane, H.C., and Fauci, A.S. (1999).

Re-emergence of HIV after stopping therapy. *Nature* *401*, 874-875.

Chun, T.W., Engel, D., Berrey, M.M., Shea, T., Corey, L., and Fauci, A.S. (1998).

Early establishment of a pool of latently infected, resting CD4(+) T cells during primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 8869-8873.

Chun, T.W., Nickle, D.C., Justement, J.S., Meyers, J.H., Roby, G., Hallahan, C.W., Kottlilil, S., Moir, S., Mican, J.M., Mullins, J.I., *et al.* (2008). Persistence of HIV in gut-associated lymphoid tissue despite long-term antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* *197*, 714-720.

Coleman, C.M., and Wu, L. (2009). HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. *Retrovirology* *6*, 51-4690-6-51.

Collins, A.F., Pearson, H.A., Giardina, P., McDonagh, K.T., Brusilow, S.W., and Dover, G.J. (1995). Oral sodium phenylbutyrate therapy in homozygous beta thalassemia: a clinical trial. *Blood* *85*, 43-49.

Dokmanovic, M., Clarke, C., and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol. Cancer. Res.* *5*, 981-989.

Dover, G.J., Brusilow, S., and Charache, S. (1994). Induction of fetal hemoglobin production in subjects with sickle cell anemia by oral sodium phenylbutyrate. *Blood* *84*, 339-343.

du Chene, I., Basyuk, E., Lin, Y.L., Triboulet, R., Knezevich, A., Chable-Bessia, C., Mettling, C., Baillat, V., Reynes, J., Corbeau, P., *et al.* (2007). Suv39H1 and HP1gamma are responsible for chromatin-mediated HIV-1 transcriptional silencing

and post-integration latency. *Embo j.* *26*, 424-435.

Duverger, A., Wolschendorf, F., Zhang, M., Wagner, F., Hatcher, B., Jones, J., Cron, R.Q., van der Sluis, R.M., Jeeninga, R.E., Berkhout, B., and Kutsch, O. (2013). An AP-1 binding site in the enhancer/core element of the HIV-1 promoter controls the ability of HIV-1 to establish latent infection. *J. Virol.* *87*, 2264-2277.

Emiliani, S., Fischle, W., Ott, M., Van Lint, C., Amella, C.A., and Verdin, E. (1998). Mutations in the tat gene are responsible for human immunodeficiency virus type 1 postintegration latency in the U1 cell line. *J. Virol.* *72*, 1666-1670.

Friedman, J., Cho, W.K., Chu, C.K., Keedy, K.S., Archin, N.M., Margolis, D.M., and Karn, J. (2011). Epigenetic silencing of HIV-1 by the histone H3 lysine 27 methyltransferase enhancer of Zeste 2. *J. Virol.* *85*, 9078-9089.

Fujii, S., Tokita, K., Wada, N., Ito, K., Yamauchi, C., Ito, Y., and Ochiai, A. (2011). MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. *Oncogene* *30*, 4118-4128.

Fukumori, T., Akari, H., Yoshida, A., Fujita, M., Koyama, A.H., Kagawa, S., and Adachi, A. (2000). Regulation of cell cycle and apoptosis by human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Microbes Infect.* *2*, 1011-1017.

Geeraert, L., Kraus, G., and Pomerantz, R.J. (2008). Hide-and-peek: the challenge of viral persistence in HIV-1 infection. *Annu. Rev. Med.* *59*, 487-501.

Glozak, M.A., Sengupta, N., Zhang, X., and Seto, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* *363*, 15-23.

Gras, G., and Kaul, M. (2010). Molecular mechanisms of neuroinvasion by monocytes-macrophages in HIV-1 infection. *Retrovirology* *7*, 30-4690-7-30.

Greger, I.H., Demarchi, F., Giacca, M., and Proudfoot, N.J. (1998). Transcriptional

interference perturbs the binding of Sp1 to the HIV-1 promoter. *Nucleic Acids Res.* *26*, 1294-1301.

Han, Y., Lassen, K., Monie, D., Sedaghat, A.R., Shimoji, S., Liu, X., Pierson, T.C., Margolick, J.B., Siliciano, R.F., and Siliciano, J.D. (2004). Resting CD4<sup>+</sup> T cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected individuals carry integrated HIV-1 genomes within actively transcribed host genes. *J. Virol.* *78*, 6122-6133.

He, G., and Margolis, D.M. (2002). 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.

Imai, K., Togami, H., and Okamoto, T. (2010). Involvement of histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase G9a in the maintenance of HIV-1 latency and its reactivation by BIX01294. *J. Biol. Chem.* *285*, 16538-16545.

Ishida, T., Hamano, A., Koiwa, T., and Watanabe, T. (2006). 5' long terminal repeat (LTR)-selective methylation of latently infected HIV-1 provirus that is demethylated by reactivation signals. *Retrovirology* *3*, 69.

Jiang, G., Espeseth, A., Hazuda, D.J., and Margolis, D.M. (2007). c-Myc and Sp1 contribute to proviral latency by recruiting histone deacetylase 1 to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J. Virol.* *81*, 10914-10923.

Johannessen, C.U., and Johannessen, S.I. (2003). Valproate: past, present, and future. *CNS Drug Rev.* *9*, 199-216.

Jordan, A., Bisgrove, D., and Verdin, E. (2003). HIV reproducibly establishes a latent infection after acute infection of T cells in vitro. *Embo j.* *22*, 1868-1877.

Kao, S.Y., Calman, A.F., Luciw, P.A., and Peterlin, B.M. (1987). Anti-termination

of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product.

*Nature* *330*, 489-493.

Kim, Y.K., Mbonye, U., Hokello, J., and Karn, J. (2011). T-cell receptor signaling enhances transcriptional elongation from latent HIV proviruses by activating P-TEFb through an ERK-dependent pathway. *J. Mol. Biol.* *410*, 896-916.

Kinoshita, S., Chen, B.K., Kaneshima, H., and Nolan, G.P. (1998). Host control of HIV-1 parasitism in T cells by the nuclear factor of activated T cells. *Cell* *95*, 595-604.

Lehrman, G., Hogue, I.B., Palmer, S., Jennings, C., Spina, C.A., Wiegand, A., Landay, A.L., Coombs, R.W., Richman, D.D., Mellors, J.W., *et al.* (2005). Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* *366*, 549-555.

Lenasi, T., Contreras, X., and Peterlin, B.M. (2008). Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency. *Cell. Host Microbe* *4*, 123-133.

Lewinski, M.K., Bisgrove, D., Shinn, P., Chen, H., Hoffmann, C., Hannenhalli, S., Verdin, E., Berry, C.C., Ecker, J.R., and Bushman, F.D. (2005). Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J. Virol.* *79*, 6610-6619.

Marks, P.A. (2007). Discovery and development of SAHA as an anticancer agent. *Oncogene* *26*, 1351-1356.

Marks, P.A., and Xu, W.S. (2009). Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J. Cell. Biochem.* *107*, 600-608.

Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* *72*, 8150-8157.



Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F.H., and Verma, I.M. (1997). Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10319-10323.

Ott, M., Dorr, A., Hetzer-Egger, C., Kaehlcke, K., Schnolzer, M., Henklein, P., Cole, P., Zhou, M.M., and Verdin, E. (2004). Tat acetylation: a regulatory switch between early and late phases in HIV transcription elongation. *Novartis found. Symp.* *259*, 182-93; discussion 193-6, 223-5.

Pearson, R., Kim, Y.K., Hokello, J., Lassen, K., Friedman, J., Tyagi, M., and Karn, J. (2008). Epigenetic silencing of human immunodeficiency virus (HIV) transcription by formation of restrictive chromatin structures at the viral long terminal repeat drives the progressive entry of HIV into latency. *J. Virol.* *82*, 12291-12303.

Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Saksela, K., Markowitz, M., and Ho, D.D. (1997). Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* *387*, 188-191.

Perkins, N.D., Edwards, N.L., Duckett, C.S., Agranoff, A.B., Schmid, R.M., and Nabel, G.J. (1993). A cooperative interaction between NF-kappa B and Sp1 is required for HIV-1 enhancer activation. *Embo j.* *12*, 3551-3558.

Popov, S., Chenine, A.L., Gruber, A., Li, P.L., and Ruprecht, R.M. (2005). Long-term productive human immunodeficiency virus infection of CD1a-sorted myeloid dendritic cells. *J. Virol.* *79*, 602-608.

Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002a). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* *110*, 521-529.

Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R., and Bushman, F. (2002b). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* *110*, 521-529.

Siliciano, J.D., Lai, J., Callender, M., Pitt, E., Zhang, H., Margolick, J.B., Gallant, J.E., Cofrancesco, J., Jr, Moore, R.D., Gange, S.J., and Siliciano, R.F. (2007). Stability of the latent reservoir for HIV-1 in patients receiving valproic acid. *J. Infect. Dis.* *195*, 833-836.

Smith, B.A., Gartner, S., Liu, Y., Perelson, A.S., Stilianakis, N.I., Keele, B.F., Kerkering, T.M., Ferreira-Gonzalez, A., Szakal, A.K., Tew, J.G., and Burton, G.F. (2001). Persistence of infectious HIV on follicular dendritic cells. *J. Immunol.* *166*, 690-696.

Spire, B., Barre-Sinoussi, F., Montagnier, L., and Chermann, J.C. (1984). Inactivation of lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. *Lancet* *2*, 899-901.

Steel, A., Clark, S., Teo, I., Shaunak, S., Nelson, M., Gazzard, B., and Kelleher, P. (2006). No change to HIV-1 latency with valproate therapy. *Aids* *20*, 1681-1682.

Tyagi, M., and Karn, J. (2007). CBF-1 promotes transcriptional silencing during the establishment of HIV-1 latency. *Embo j.* *26*, 4985-4995.

Tyagi, M., Pearson, R.J., and Karn, J. (2010a). Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. *J. Virol.* *84*, 6425-6437.

Tyagi, M., Pearson, R.J., and Karn, J. (2010b). Establishment of HIV latency in primary CD4+ cells is due to epigenetic transcriptional silencing and P-TEFb restriction. *J. Virol.* *84*, 6425-6437.

Wei, P., Garber, M.E., Fang, S.M., Fischer, W.H., and Jones, K.A. (1998). A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* *92*, 451-462.

Williams, S.A., Chen, L.F., Kwon, H., Ruiz-Jarabo, C.M., Verdin, E., and Greene, W.C. (2006). NF- $\kappa$ B p50 promotes HIV latency through HDAC recruitment and repression of transcriptional initiation. *Embo j.* *25*, 139-149.

Ylisastigui, L., Archin, N.M., Lehrman, G., Bosch, R.J., and Margolis, D.M. (2004). Coaxing HIV-1 from resting CD4 T cells: histone deacetylase inhibition allows latent viral expression. *Aids* *18*, 1101-1108.

Yukl, S., Pillai, S., Li, P., Chang, K., Pasutti, W., Ahlgren, C., Havlir, D., Strain, M., Gunthard, H., Richman, D., *et al.* (2009). Latently-infected CD4+ T cells are enriched for HIV-1 Tat variants with impaired transactivation activity. *Virology* *387*, 98-108.

Zhang, H.S., Ruan, Z., and Sang, W.W. (2011). HDAC1/NF $\kappa$ B pathway is involved in curcumin inhibiting of Tat-mediated long terminal repeat transactivation. *J. Cell. Physiol.* *226*, 3385-3391.

Zhou, M., Deng, L., Lacoste, V., Park, H.U., Pumfery, A., Kashanchi, F., Brady, J.N., and Kumar, A. (2004). Coordination of transcription factor phosphorylation and histone methylation by the P-TEFb kinase during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *J. Virol.* *78*, 13522-13533.