

201024035A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23年3月

研究代表者
宮崎 義継

(国立感染症研究所)

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

平成22年度 総括・分担研究報告書

平成23年3月

研究代表者
宮崎 義継

(国立感染症研究所)

平成22年度 難治性疾患克服研究事業
「特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究」班

班員名簿

氏 名	所 属	職 名
宮崎 義継	国立感染症研究所・生物活性物質部	部 長
佐多 徹太郎	国立感染症研究所・感染病理部	部 長
朝長 啓造	大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野	准教授
近藤 一博	東京慈恵会医科大学医学部・ウイルス学講座	教 授
山谷 睦雄	東北大学大学院医学系研究科・先進感染症予防学講座	教 授
荒川 宜親	国立感染症研究所・細菌第二部	部 長
和田 昭仁	国立感染症研究所・細菌第一部	室 長
渋谷 和俊	東邦大学医学部・病院病理学講座	教 授
竹末 芳生	兵庫医科大学・感染制御学講座	教 授
河野 茂	長崎大学大学院・感染免疫学講座	教 授

目次

I. 総括研究報告書	
特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究	1
研究代表者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）	
II. 分担研究報告書	
1. 難治性血管炎と微生物の多糖抗原	7
研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）	
2. 特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与	12
研究分担者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）	
3. 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性	16
研究分担者：朝長 啓造（大阪大学微生物病研究所・ウイルス免疫分野）	
4. 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明に関する研究	20
研究分担者：近藤 一博（東京慈恵会医科大学・ウイルス学講座）	
5. 慢性肺気腫あるいは呼吸不全とウイルス感染	25
研究分担者：山谷 睦雄（東北大学・先進感染症予防学寄附講座）	
6. マイコプラズマ感染と特定疾患の関連性に関する研究	34
研究分担者：荒川 宜親（国立感染症研究所・細菌第二部）	
7. 炎症性腸炎(回腸嚢炎)の病態と硫化水素産生菌量の関連	38
研究分担者：和田 昭仁（国立感染症研究所・細菌第一部）	
8. 糸状菌誘発肺高血圧症モデルにおける遺伝子発現解析	41
研究分担者：渋谷 和俊（東邦大学医学部病院・病理学講座）	
9. 炎症性腸疾患（IBD）におけるPCRを用いたMRSA保菌のスクリーニング と術後感染予防効果に関する研究	45
研究分担者：竹末 芳生（兵庫医科大学・感染制御学講座）	
10. IgA腎症と感染症	48
研究分担者：河野 茂（長崎大学大学院・感染免疫学講座）	
III. 研究成果に関する刊行一覧表	53

I. 総括研究報告書

総括研究報告書

特定疾患の微生物学的原因究明に関する研究

研究代表者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）

研究要旨：当研究班では、特定疾患の原因となる病原性微生物の関与を明らかにし、難病の発症予防あるいは効果的な治療法の開発に寄与することを目的として研究を行った。難治性血管炎と真菌感染、特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与、神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性、神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明、慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染、マイコプラズマ感染と特定疾患の関連、炎症性腸疾患に対する硫化水素産生菌の影響、炎症性腸疾患術後感染の予防、糸状菌吸入による肺高血圧症マウスモデルとヒト肺高血圧症の比較解析、IgA腎症など進行性腎障害と感染症、に関する研究を行った。いくつかの特定疾患に関して病原微生物との関連性が示され、一部の疾患では治療に直結する知見が得られた。

A. 研究目的

特定疾患の多くは原因が不明である。感染が契機となり自己免疫疾患が発症したり、微生物の潜伏・持続感染、あるいはそれらの再活性化が原因となる可能性、さらには未知の病原体の関与も想定される。当研究班では臨床研究班と連携を図り、特定疾患を引き起こす病原体と発症機序を解明し、その結果として発症の予防あるいは治療法の開発に寄与することを目的とした。

B. 研究方法

それぞれの研究目的に応じて、下記に示すように遺伝子組み換え病原体や培養細胞、動物感染モデル、臨床検体などを使用した。

1) 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子、マウス血管炎を惹起する *Candida albicans* 細胞壁の β -1,2マンノース転移酵素と推定される遺伝子の破壊株および相補株を作製した。それらの菌株のマンナンを精製し、炎症性サイトカイン誘導能を測定した。また、一部の菌株のマンナンの構造解析を行った。（宮崎）

2) 特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与。九州大学医学部の拡張型心筋症（DCM）及び非DCM患者（其々4

人及び13人）検体由来RNAを用いたリアルタイムRT-PCR及びDNAマイクロアレイ解析により、関連遺伝子の発現レベルを定量した。（佐多）

3) 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性。1. ボルナウイルスに関する抗体疫学調査：大阪大学医学部附属病院小児科外来受診中患児（大阪大学医学部倫理委員会承認済）の血清を用いて、ボルナ病ウイルス（BDV）に対する抗体の検出を行った。2. BDVの病原性解析：i) BDVの新規病原性機構：BDV由来遺伝子の宿主細胞ゲノムへのインテグレーション様式とその効率について解析を行った。ii) マウスモデルを用いた病原性解析：BDVの病原遺伝子Pを脳内で発現するトランスジェニックマウス（P-Tg）を用いた解析を行った。（朝長）

4) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明。これまでに、うつ病患者やクローン病患者で特異的に発現が検出されるヒトヘルペスウイルス(HHV)-6が疲労と関係することを明らかにした。今回、疲労とHHV-6潜伏感染細胞の分化と活性化の関係を明らかにするため、疲労負荷動物のDNAマイクロアレイ解析を行った。また、慢性疲労症候群患者(CFS)におけるHHV-6再活性化を検討した。（近藤）

5) 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染.
1. 風邪症状に合併した肺気腫増悪患者で血清RSウイルス抗体価と炎症性物質を測定した。2. ヒト気管上皮細胞にライノウイルス、季節性A香港型インフルエンザウイルス、新型インフルエンザウイルスを感染させ、ウイルス放出、炎症性物質、浮遊細胞数を測定した。また、薬剤によるウイルス感染抑制効果を調べた。(山谷)

6) マイコプラズマ感染と特定疾患の関連.
*Mycoplasma fermentans*生菌のウサギ経後脚膝蓋関節腔内投与によるリウマチ性疾患モデルを用いて解析するとともに、臨床診断系が存在しない*M. fermentans*について、開発中の糖脂質抗原を用いた新規診断法の評価を行った。また、本糖脂質を前投与し、関節炎病態への影響を解析した。さらに、滑膜細胞の増生やリンパ濾胞形成を惹起する*M. fermentans*の抗原を同定することを目的としてLC-MS解析を行った。(荒川)

7) 硫化水素産生菌が炎症性腸炎に及ぼす影響に関する研究. 昨年度開発したりアルタイムPCRによる硫化水素産生菌数の定量検出系をもちい、炎症性腸炎、特に回腸囊肛門吻合術後の回腸囊炎に見られる炎症の程度と菌量の関係を調べた。(和田)

8) 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析. 環境内真菌である*Stachybotrys chartarum*の孢子懸濁液をマウスに経気管的反復接種した後、肺組織より抽出したRNAを試料とし、遺伝子発現様式をマイクロアレイにて網羅的に検出し、既報のヒトpulmonary arterial hypertension (PAH)結果と比較検討した。(渋谷)

9) 炎症性腸疾患に対する病原微生物の関与. 炎症性腸疾患 (IBD) 手術に加え、対照として肝胆膵手術を対象とし、入院時 (または手術決定時) ならびに手術後1回/週、PCRによるMRSAの迅速検査を行い、陽性者に対し、除菌プロトコル (鼻腔ムピロシン塗布+クロルヘキシジン含有石鹸による全身浴)、予防抗菌薬としてバンコマイシン使用、接触予防策を2年間実施し、前2年間の観察期間とのMRSA感染の頻度を比較し、その有効性を検討した。(竹末)

10) IgA腎症など進行性腎障害と感染症. 質量顕微鏡を使用し、IgA腎症患者と自然発症のIgA腎症様病態を呈するヒトIgA腎症モデルマウスである若年好発性高IgA血症 (HIGA) マウスの腎組織に沈着している物質を明らかにし、病原微生物との関連を検討した。また、IgA腎症患者と非IgA腎症患者の扁桃を用いて、特異的な細菌叢の存在を検討するために網羅的に解析を行った。(河野)

(倫理面への配慮)

全ての研究は国立感染症研究所または各研究機関の研究倫理委員会の承認を得たプロトコールにしたがって行われた。インフォームドコンセントは厚生労働省のガイドラインに準拠した同意書を作成し、これに患者またはこれに代わる親権者の同意を得た。また、遺伝子組換え実験は当該施設の承認の後、遺伝子組換え実験ガイドラインに沿って行われた。

C. 研究結果

1) 難治性血管炎を誘発する真菌特異的分子.
Candida albicans 細胞壁の β -1,2結合型マンノース転移酵素遺伝子破壊株、及びその遺伝子相補株と比較対象株を作製した。 β -1,2結合型マンノース転移酵素遺伝子破壊株では、 β -1,2結合型マンノースを認識する因子血清の反応が消失し、遺伝子相補株では反応が回復した。さらに、その遺伝子破壊株と親株のマンナンを薄層クロマトグラフィー及びNMRで解析を行ったところ、親株のマンナンで検出された β -1,2結合型マンノースが遺伝子破壊株では認められなかったことより、遺伝子破壊株では β -1,2結合型マンノースが欠損していることが確認された。 β -1,2結合型マンノース欠損株のマンナンは親株のマンナンと比較して、マウス樹状細胞からの炎症性サイトカインの産生誘導が増強していた。また、遺伝子相補株のマンナンは比較対象株のマンナンと比較して、炎症細胞の産生誘導が低下していた。(宮崎)

2) 特定疾患におけるレトロウイルスの関与.
DCM患者心筋におけるDCM関連遺伝子の発現レベル定量的ため、リアルタイムPCRの系を樹立した。DCM及び非DCM患者の心筋生検サンプルより抽出されたtotal RNA計17検体における、レトロ

ランスポゾン・内在性レトロウイルス遺伝子5種類、それらを制御する宿主自然免疫関連遺伝子8種類、及びDCM関連遺伝子16種類全てのreal-time RT-PCR解析の結果、いかなる遺伝子発現においてもDCM及び非DCM患者間で統計上有意味な差は認められなかった。また、全てのAPOBEC3ファミリー蛋白が抗Aluレトロ転移活性を有すること、またAPOBEC3GにおいてはそのN末が抗Alu活性を有すること、APOBEC3Gの二量体化が抗Alu活性に重要であることを明らかにした。
(佐多)

3) 神経変性疾患と遅発性ウイルス感染との関連性. 1. ボルナウイルスに関する抗体疫学調査目的で、組換えBDV N蛋白質を用いて、小児サンプルを対象にウェスタンブロットを行った。その結果、15検体中3検体で陽性反応が観察された。一方、ラジオリガンド法を用いて反応性を解析した結果、BDV NならびにP抗原に対しても15検体中1例の陽性であった。しかしながら、今回の解析では、異なる検出方法と抗原において共通した陽性検体は確認されなかった。2. BDVの病原性解析 i) BDVの新規病原性機構：BDV持続感染細胞から抽出したDNAをinverse PCRにより解析を行った結果、レトロトランスポゾンであるLINE (long interspersed nuclear element) がBDVの逆転写とインテグレーションに関与していることが示唆された。また、その効率は持続感染細胞において $1.5 \cdot 10^2$ 細胞に1コピーとレトロウイルスと比べて極めて低いことが分かった。ii) マウスモデルを用いた病原性解析：P-Tgのアストログリア細胞では、インスリン様成長因子結合蛋白質3 (IGFBP3) が顕著に上昇していることが明らかになった。IGFBP3のアンタゴニストであるインスリンをP-Tg由来神経初代培養に添加した結果、神経細胞の生存率に顕著な上昇が認められた。また、P-Tg小脳ではインスリン様成長因子受容体のリン酸化が顕著に低下しており、P-Tg小脳におけるインスリン関連シグナルの異常が示唆された。(朝長)

4) 神経疾患及び消化器疾患の起因ウイルスの解明. 疲労負荷動物のDNAマイクロアレイ解析により、疲労刺激によってHHV-6の潜伏感染部位であるマクロファージの分化や活性化に関係する分子の発現の上昇が観察され、疲労がマクロファージの分化・活性化を生じさせることが

判った。また、HHV-6再活性化は、CFS患者では増加せず、むしろ減少する傾向があることが判った。これは、CFSにおける疲労が通常の生活における疲労とは異なり、疲労感のみが亢進していることを示すものと考えられた。(近藤)

5) 慢性肺気腫ないし呼吸不全とウイルス感染. 今回4症例追加した臨床研究の結果、肺気腫増悪患者27例中5例でRSウイルス血清抗体価上昇を認めた。

抗体価の上昇した5症例において、血中IL-6および可溶性ICAM-1の上昇を認めた。また、ヒト気管上皮細胞を用いた解析にて、新型インフルエンザウイルス(A/H1N1 pdm)は季節性インフルエンザ(A香港型)に比較して、ウイルス放出量、浮遊細胞数、IL-6産生量が高かった。薬剤によるウイルス増殖抑制効果の解析にて、クラリスロマイシン、L-カルボシステイン及びセリン・プロテアーゼ阻害薬は新型インフルエンザウイルスの培養液放出量を減少させることが分かった。また、長時間作用型抗コリン薬チオトロピウムがライノウイルス感染受容体ICAM-1発現と炎症性サイトカイン放出を抑制し、ライノウイルスの培養液放出量を減少させることが明らかになった。チオトロピウムによる炎症抑制機序を理解するため転写因子NF- κ Bについて解析したところ、核抽出蛋白p50、p65およびc-Rel量は減少した。また、細胞質蛋白のリン酸化I- κ B- α (p-I- κ B- α)はを減少し、逆にI- κ B- α 量はを増加した。

(山谷)

6) マイコプラズマ感染と特定疾患の関連.

*M. fermentans*生菌を膝蓋関節腔内投与することで、関節内リンパ球浸潤、リンパ濾胞形成や滑膜細胞の多層化を認め、ヒトの関節リウマチにおける慢性期への移行を疑わせる所見と考えられた。*M. fermentans*脂質の前投与後の生菌投与群においては、所見スコアは減少した。ヒトのRAの早期血清診断法で用いられる抗環状シトルリン化ペプチド (cyclic citrullinated peptide: CCP) CCP抗体価の軽微な上昇が、生菌投与後に認められた。また、ウェスタン・ブロッティング解析にて、*M. fermentans*投与77日後のウサギ血清と反応する菌体超音波破碎物の幾つかの蛋白バンドを認めた。そのうち、28kDa周辺の蛋白解析において、リポ蛋白P29が抗原蛋白候補として推定された。(荒川)

7) 硫化水素産生菌が炎症性腸炎に及ぼす影響に関する研究。 昨年開発したリアルタイムPCR検出系を用いた解析の結果、活動期の回腸囊炎から得られた検体からは強陽性結果が得られ、硫化水素産生菌の増加と炎症増悪との関連が示唆された。(和田)

8) 糸状菌吸入による肺高血圧および血管構築改変の機序に関する解析。 マイクロアレイ解析の結果、実験群とコントロール群の発現値の差が10倍以上と大きく変動していた遺伝子は免疫応答や血管新生、細胞増殖に抑制的に働く遺伝子であった。報告されているヒトPAHでの遺伝子発現変動と今回の実験結果を比較すると、ヒトPAHの主導因子と考えられている bone morphogenetic protein receptor, type II (BMPRII), activin receptor-like kinase1 (ALK-1), Endoglin をコードする遺伝子の変動パターンは本モデルとヒトPAHで一致していた。(渋谷)

9) 炎症性腸疾患に対する病原微生物の関与。 2年間のprospective studyの途中経過(10か月)の解析にて、MRSAが術前PCR陰性で手術後PCR陽性転化した症例はIBD手術で19.1%と高率であった。対照とした肝胆膵手術ではMRSAによる術後感染低下傾向を認めしたが、IBD手術ではMRSA手術部位感染はPCR導入前3.9%、PCR導入後7.4%と改善を認めなかった。(竹末)

10) IgA腎症など進行性腎障害と感染症。 IgA腎症モデルマウスとして使用したHIGAマウスの腎組織を採取し、質量顕微鏡による検討を行った。コントロールマウスと比較し、モデルマウスにおいて腎組織内に分布が異なる物質の存在が数種類明らかとなった。また、IgA腎症ならびに非IgA腎症患者両者の扁桃からゲノムDNAを抽出し、大規模シーケンスを用いた既知微生物ゲノムとの比較による微生物の網羅的解析を行っている。(河野)

D. 考察

真菌が関与する可能性のある難病として、血管炎と原発性肺高血圧症との関連について研究を行った。最も頻度の高い深在性真菌症の原因菌である*C. albicans*の細胞壁表層のマンノース構造が病原因子の一つと考えられる炎症誘導能および血管炎の発症に関連することが示された。

原発性肺高血圧症(PAH)との関連性が示された*S. chartarum*によるマウス肺動脈病変とヒトPAHの遺伝子のマイクロアレイ解析を行った。本疾患の主導遺伝子と考えられていた遺伝子群は本実験でもヒトPAHと同様の発現変動が確認されたことから、これらの遺伝子発現変動は外的要因にて誘発される因子であると考えられた。

特定疾患におけるレトロトランスポゾン・内在性レトロウイルス及び宿主自然免疫蛋白の関与について検証することを目的とし、拡張型心筋症(DCM)を標的として、患者心筋におけるDCM関連遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRで定量した。今回入手したDCM及び非DCM患者心筋検体において、標的遺伝子29種類のmRNA発現レベルに大きな差は認められなかったが、限られた患者心筋検体数においてその統計的有意差の有無を決定することは困難である。それゆえ、今後は更に検体数を増やして検証していく必要性が考えられた。同時に、生検サンプルの入手が本質的に困難なDCMに限局せず、レトロトランスポゾンの関与が示唆されている他の特定疾患も視野に入れて、解析対象を拡大していくことも肝要であると思われた。

神経変性疾患とボルナ病ウイルス感染との関連性に関する研究では、小児サンプルにおいてもBDVに対する特異抗体の存在が示された。しかし、検出方法や使用したウイルス抗原により陽性者にばらつきが認められた。今後、疾患とボルナウイルス感染との関連性についてはさらなる調査が必要と考えられた。BDVの病原性解析では、BDV mRNAが宿主DNAに組み込まれる機構が明らかとなり、BDV感染による宿主ゲノムへの変異誘導というRNAウイルスの新しい病原性機序が示された。一方、培養細胞での感染モデルから、BDVの宿主ゲノムへの組み込みがレトロウイルスと比較して極めて低いことが示された。さらに、BDVの病原性モデルであるP-Tgマウスを用いた解析から、BDVのP蛋白質発現による神経細胞あるいはグリア細胞でのIGFBP3の発現異常とインスリンシグナルの混乱がBDVの神経病原性に関与する可能性が示された。

HHV-6と神経疾患に関する研究では、これまでに疲労によるHHV-6の再活性化とHHV-6の潜伏感染特異的神経病原性遺伝子SITH-1の発現が関係することを明らかにした。うつ病などの精神症状の合併が多く、その原因としてウイルス

感染が疑われている慢性疲労症候群(CFS)患者では、SITH-1発現を伴う気分障害患者が高頻度で出現することから、疲労とCFSとの異同が重要であると考えられた。今回、これまでのHHV-6再活性化による疲労測定システムをさらに精度の高いものとし、CFS患者の疲労病態を件検討した。その結果、CFS患者の疲労と通常の労働による疲労は、質的に異なったものであることが判明した。

呼吸不全とウイルス感染症の研究では治療可能な方法論や病態解析を検討した。今回の結果から、RSウイルス感染は気道炎症を惹起し肺気腫を増悪させ呼吸不全をもたらすことが示唆され、臨床病態はライノウイルス感染時と類似することが明らかになった。また、新型インフルエンザウイルス感染のヒト気管上皮細胞に対する傷害性を検討し、新型インフルエンザウイルスの感染は季節性インフルエンザに比べて細胞傷害性や炎症惹起能力、ウイルス増殖能力が高いことが示唆された。薬剤によるウイルス増殖抑制効果の解析にて、新型インフルエンザ感染の重症化阻止法としてマクロライドおよびカルボシステインの有用性が示唆された。ライノウイルス感染に関しても、長時間作用型抗コリン薬であるチオトロピウムが、ヒト気道上皮における感染受容体ICAM-1発現抑制、NF-kappa B抑制を介した炎症性サイトカインの産生減少効果を示した。この機序は、ヒト気道上皮細胞において、チオトロピウムがライノウイルス感染による気道炎症抑制作用に関与すると示唆され、呼吸不全に対する治療応用の可能性を示した。

関節リウマチと*M. fermentans*の関連では、生菌投与動物モデルを作製した。膝蓋関節腔内投与ウサギの関節において、滑膜細胞の多層化、リンパ濾胞形成を顕著に認め、その関節炎所見は、*M. fermentans*脂質抗原の前投与により軽減した。LC-MS解析の結果から、滑膜細胞の増生やリンパ濾胞形成を惹起する*M. fermentans*の抗原として、菌体膜成分であるリポ蛋白P29が推定された。

炎症性腸疾患と感染症の関連について行った研究では、本研究で開発したリアルタイムPCR検出系により、*Desulfovibrio*の便からの定量検出が可能となった。15検体を用いた予備試験では、活動期の回腸囊炎から得られた検体からは強陽性結果が得られ、この菌の増加と炎症の増悪との関連が示唆された。本研究の期間では、

十分な数の臨床検体が得られなかったため、今後、①回腸囊炎症例/非回腸囊炎、②回腸囊炎の活動期/寛解期(治療後)、③潰瘍性大腸炎活動期/寛解期、④クローン病活動期/寛解期の症例から得られた検体を比較し、得られた結果に統計的有意差が見られるかどうかの検討が必要と考えられた。また、IBD患者ではPCRによるMRSA保菌迅速検査を用いた対策での効果は認められなかったが、肝胆膵手術では改善傾向を示した。これは、IBD患者は低栄養、ステロイド使用など易感染患者であったこと、内因性感染よりむしろ病棟の違いによる外因性感染による影響が大きかったことが推察された。

IgA腎症など進行性腎障害と感染症の関係については、IgA腎症モデルのHIGAマウス特異的な分子として、複数のPCと推測される分子を見出した。HIGAの尿細管病変にほぼ一致し、おそらく、尿細管領域の変化を反映したものであると考えられた。現在LC-MSにて解析中である。まだ分子の同定はできていないが、これらの分子は、病変部に虚血性変化を来す前から存在しており、虚血性変化との因果関係についても興味深い結果となった。

E. 結論

真菌と血管炎及び原発性肺高血圧症との関連について研究では、*C. albicans*の表層を構成するマンナンの構造の違いが炎症惹起、血管炎発症に関与することが示唆された。また、原発性肺高血圧症の病態形成には、正常な機能を有しない内皮細胞や線維芽細胞の増殖が深く関与していると考えられた。

拡張型心筋症(DCM)とレトロトランスポゾン・内在性レトロウイルスの関係については、今回解析した少数のDCM患者由来心筋細胞においては、レトロトランスポゾン・内在性レトロウイルスが原因と考えられるDCM関連遺伝子の発現異常は認められなかった。

神経変性疾患とボルナ病ウイルス(BDV)感染との関連性に関する研究では、人においてBDV感染を示唆する調査結果が得られた。また、宿主細胞のゲノムへRNAウイルス遺伝子の組み込みという新たな病原機序を突き止めた。

過労と同様に気分障害の発症原因となる慢性疲労症候群(CFS)の疲労は、通常の過労とは同一のものでないことが判明し、その異同に関する検討が重要であると考えられた。

呼吸不全とウイルス感染症の研究では1) 肺気腫増悪におけるRSウイルスの関与、2) 新型インフルエンザ感染による気道炎症の特徴、3) マクロライド・カルボシステイン、およびセリン・プロテアーゼ阻害薬の新型インフルエンザウイルス感染・気道炎症抑制作用、4) プロテアーゼ阻害薬の季節性インフルエンザウイルス感染抑制作用が明らかになった。

関節リウマチと*M. fermentans*の関連では、作成した動物モデルにおける評価から、関節リウマチ患者における*M. fermentans*糖脂質合成物を抗原としたELISA系の新規診断系としての有用性が示唆された。

炎症性腸疾患と感染症の関連では、培養によらない硫化水素産生菌の定量が可能になった。IBD手術患者におけるPCRを用いたMRSA保菌のスクリーニングによる術後感染予防効果は認めなかった。

IgA腎症モデルマウスであるHIGAマウスの腎臓を用いて、HIGAの腎臓に特異的に分布する分子を見出した。しかし、これまでの解析結果では、微生物由来の分子は同定されなかった。

F. 健康器危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表. 各研究分担者の項を参照。
2. 学会発表. 各研究分担者の項を参照。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得. 各研究分担者の項を参照。

実用新案登録. なし

その他. なし

II. 分担研究報告書

分担研究報告書

1. 難治性血管炎と微生物の多糖抗原

研究分担者：宮崎 義継（国立感染症研究所・生物活性物質部）

研究協力者:	金城 雄樹	(国立感染症研究所・生物活性物質部)
	大川原 明子	(国立感染症研究所・生物活性物質部)
	山越 智	(国立感染症研究所・生物活性物質部)
	梅山 隆	(国立感染症研究所・生物活性物質部)
	樽本 憲人	(国立感染症研究所・生物活性物質部)
	大野 秀明	(国立感染症研究所・生物活性物質部)
	渋谷 和俊	(東邦大学医学部病院・病理学講座)
	藤原 永年	(大阪市立大学大学院・医学研究科細菌学分野)
	中 崇	(大阪市立大学大学院・医学研究科細菌学分野)
	土江 松美	(大阪市立大学大学院・理学研究科分析室)

研究要旨：*Candida albicans*の細胞壁成分であるマンナン蛋白・ β グルカン複合体をマウス腹腔に投与することによって血管炎が誘発されることが報告されている。血管炎等の炎症反応誘発に直接関与する分子の同定を目的として、*C. albicans*の β -1,2結合型マンノースの転移酵素と推定される遺伝子の破壊株及び相補株を作製し、マンナンを精製して解析を行った。構造解析及び因子血清による解析にて、破壊株では β -1,2マンナンがほとんど欠損していることを確認した。マンナン構造の違いによる免疫細胞刺激の違いの有無を調べるため、マウス樹状細胞を用いて解析を行ったところ、 β -1,2マンナン欠損株のマンナンは樹状細胞を刺激し、IL-6やIL-23などの炎症性サイトカインの産生を強く誘導した。また、遺伝子相補株のマンナンでは炎症性サイトカインの誘導が低下した。以上の結果より、カンジダ細胞壁表層構造が炎症惹起性に深く関与することが示唆された。

A. 研究目的

Candida albicans (*C. albicans*) の細胞壁可溶成分であるマンナン蛋白・ β グルカン複合体がマウス血管炎誘発に関与することが報告されているが、炎症惹起の原因分子は明らかになっていない。*C. albicans*細胞壁は、定常状態において、表層部を β -1,2結合型マンノースが、深層部を α -1,2結合型マンノースが構成すると考えられている。本研究では、マンナン構造の違いが血管炎などの炎症反応の誘発に影響を及ぼすかどうか解析を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子破壊株の作製

C. albicans β -1,2マンノース転移酵素と推定される遺伝子の破壊株および相補株を作製した。ホスホマンナンを欠損するMNN41217株 (Δ ura3, Δ arg4) を用いて、それぞれの標的遺伝子ORFの5'末端と3'末端を増幅しURA3遺伝子にligationした遺伝子片により形質転換に使用した。URA3マーカーを用いて一方のlocusを破壊した後に、同様な手順でARG4マーカーにより他のlocusを破壊し欠損株を作製した。その相補株および比較対象株を作製した。本研究で使用、作製した株を表1に示す。

2. マンナン精製

親株あるいは変異株の菌体を100°Cの2%水酸化

表1 本研究で作製した遺伝子破壊株と遺伝子相補株（本報告書と関係する株のみ記載）

株番号	特徴
CAUR6000	親株
MNN41217	Phosphomannanの欠損と推定
CAMN1105	phosphomannan, β -1,2 mannoseの欠損と推定
CAMN1301	CAMN1105の遺伝子相補株
CAMN1302	CAMN1301の比較対象株

カリウム水溶液で熱アルカリ抽出し、フェーリング試薬反応でマンナンを精製した。

3. マンナン構造解析

カンジダチェック因子血清F5,6との反応性で表層構造を解析した。さらに、リン酸基に結合するホスホマンナンを詳細に解析するため、弱酸加水分解によりCAUR6000及びCAMN1105マンナンのリン酸基結合を切断し、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分画し、薄層クロマトグラフィーで解析した。また、弱酸加水処理後にアセトリシスを行い（主鎖の α -1,6結合を切断）、側鎖のマンナンを遊離させ、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分画し、薄層クロマトグラフィー及びNMRによる解析を行った。

4. サイトカイン誘導能の測定

マウス大腿骨および脛骨から骨髓細胞を採取し、GM-CSF存在下1週間培養した後、磁気細胞分離装置 (Magnetic Cell Sorting : MACS) を使用してCD11c陽性樹状細胞を精製した。親株または変異株由来マンナンで刺激し、炎症性サイトカインIL-6、IL-23産生をELISAにて測定した。

(倫理面への配慮) 動物実験にあたっては、国立感染症研究所動物実験委員会の承認を得て、動物愛護の指針にもとづいて行った。

C. 研究結果

1. β -1,2マンノース転移酵素候補遺伝子破壊株及び相補株の作製

ホスホマンナン欠損株 (MNN412-17) を用いて遺伝子破壊を行い、 β -1,2結合型マンノースを欠損していると推定される株 (CAMN1105)、およびその遺伝子相補株 (CAMN1301) と比較対象株 (CAMN1302) を作製した。標的遺伝子の

L W D1 D2 D3 R1 R2 R3 NC L

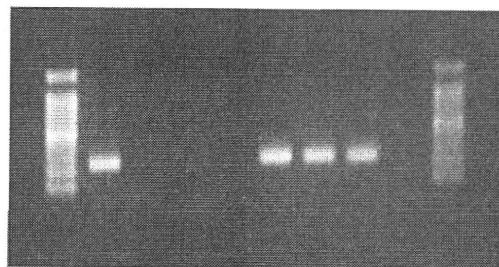


図1. β -1,2マンノース転移酵素遺伝子破壊株及び相補株のPCR結果 L; 100 bp DNA ladder、W;野生型、D1-3; β -1,2マンノース転移酵素遺伝子破壊株、R1-3; β -1,2マンノース転移酵素遺伝子相補株、NC ; PCRに鋳型を添加しない対照実験

内部にプライマーを設計しPCRを試みた結果、3つの欠損株クローン (D1-D3) では、いずれも増幅されなかった。このことから、標的遺伝子はゲノム上から消失していることが示された。一方、野生型株 (W) および相補株 (R1-R3) では、PCRによる標的断片の増幅を認め、相補株では標的遺伝子がゲノム上に再導入されていることが確認された。

2. β -1,2マンノース転移酵素遺伝子破壊株及び相補株から精製したマンナンの因子血清解析

因子血清 F5, F6は β -1,2マンノースに反応するポリクローナル抗体であり、親株CAUR6000株、MNN412-17株由来のマンナンでは、反応性を認める (図2、3)。しかし、CAMN1105株から精製したマンナンでは、反応性を認めないことから表面に β -1,2マンノースがないことが示唆された (図2、3)。さらに、遺伝子相補株 (CAMN1301) では、反応性が回復し、比較対象株 (CAMN1302) では反応性を認めなかった。以上の結果から、 β -1,2結合型マンノースは、CAMN1105株では欠損し、CAMN1301株では存在していると考えられた。

3. 親株及び β -1,2マンノース転移酵素遺伝子破壊株マンナンの構造解析

親株CAUR6000及び β -1,2マンノース転移酵素遺伝子破壊株CAMN1105のホスホマンナンをゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分画し、薄層クロマトグラフィーで解析した。CAUR6000株では二糖 (Man 2)、三糖 (Man 3) 及び四糖 (Man

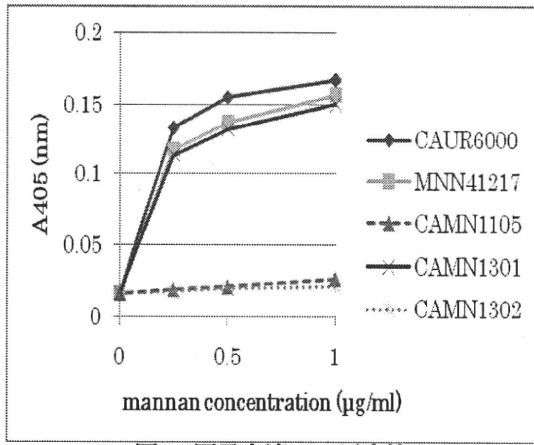


図2. 因子血清F5の反応性

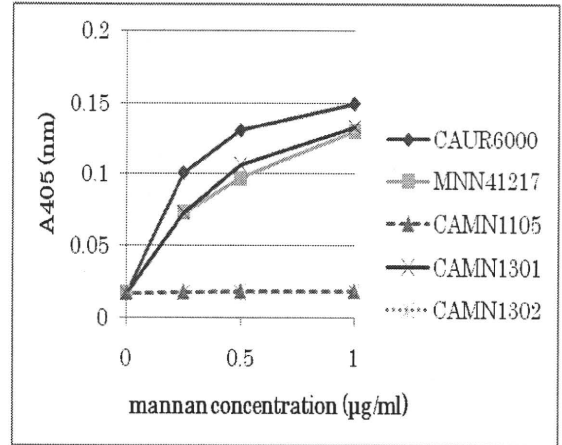


図3. 因子血清F6の反応性

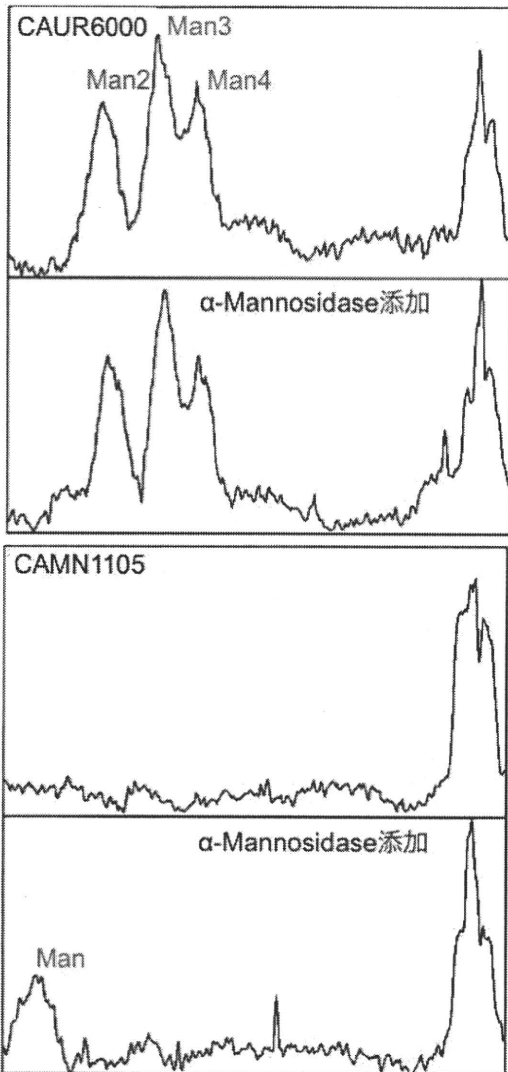


図4. ホスホマンナン の薄層クロマトグラフィー解析 Image Jを用いて、スポットの濃淡を示した。

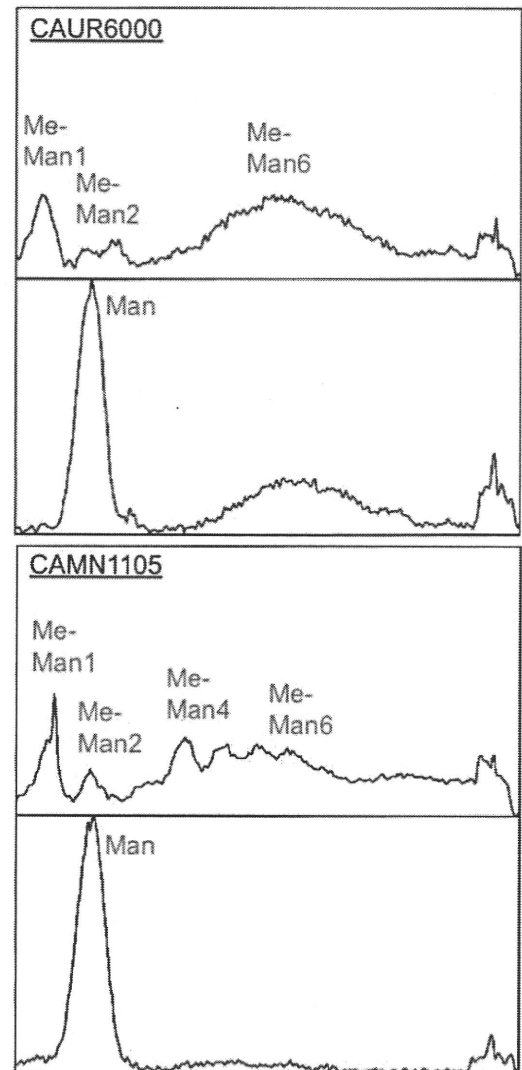


図5. 側鎖 (弱酸安定化) マンナン の薄層クロマトグラフィー解析 Image Jを用いて、スポットの濃淡を示した。

4) のオリゴサッカライドを認め、 α -mannosidase 処理にて影響を受けないことから、これらの糖は β 結合型であることが確認された (図4)。対照的に、CAMN1105株ではオリゴサッカライド

を認めないことから、 β -1,2マンノースを含むホスホマンナンが欠損していることが分かった (図4)。

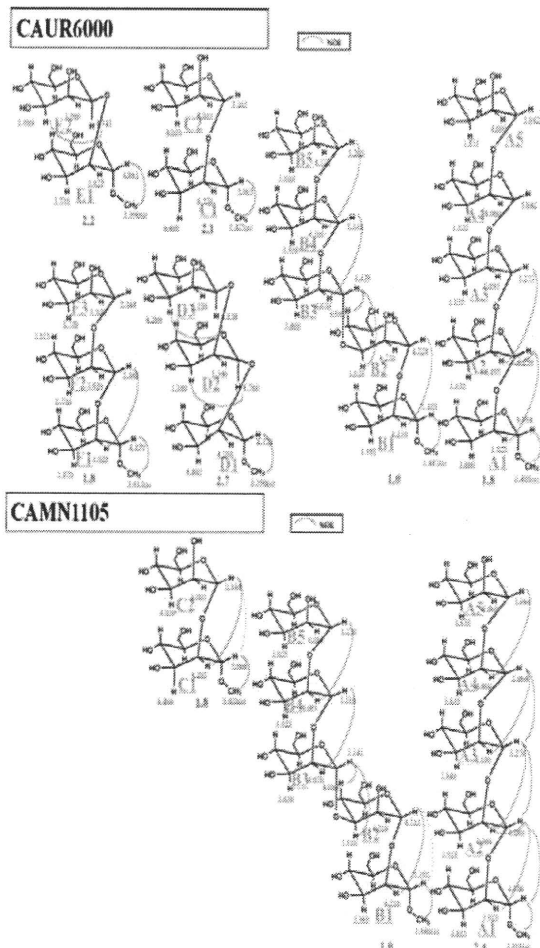


図6. 側鎖（弱酸安定化）マンナンのNMR解析

次に、側鎖（弱酸安定化）マンナンをゲルろ過クロマトグラフィーを用いて分画し、薄層クロマトグラフィーによる解析を行った。CAUR6000株では単糖（Man 1）、二糖（Man 2）及び六糖（Man 6）を認め、Man 6は α -mannosidase処理にて分解されないことから、 β 結合型であることが分かった（図5）。一方、CAMN1105株では、検出されたMan 1、Man 2、四糖（Man 4）及びMan 6全てが、 α -mannosidase処理にて全て分解されたことより、 β -1,2マンノースが欠損していることが分かった（図5）。

さらに、側鎖（弱酸安定化）マンナンのNMR解析の結果、CAUR6000株で認められる β -1,2結合型のマンノースが、CAMN1105株では検出されなかった（図6）。以上の解析結果より、CAMN1105株では β -1,2結合型のマンノースが欠損していることが確認された。

4. β -1,2マンノース転移酵素遺伝子破壊株マンナン刺激によるサイトカイン産生誘導

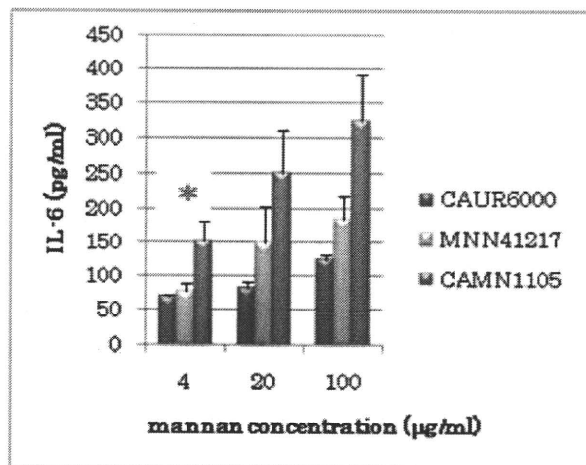


図7. β -1,2マンノース転移酵素遺伝子破壊株マンナンによるIL-6産生誘導 CAMN1105、MNN41217間で有意差あり ($p < 0.05$)

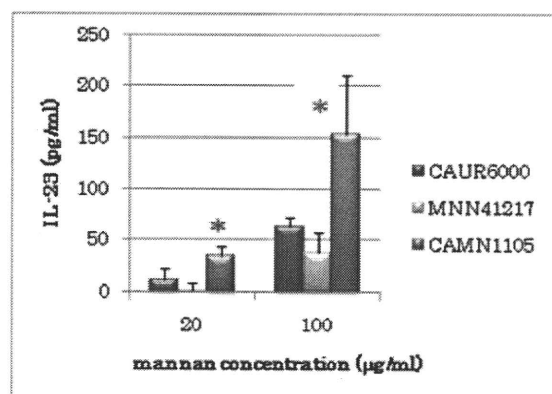


図8. β -1,2マンノース転移酵素遺伝子破壊株マンナンによるIL-23産生誘導 CAMN1105、MNN41217間で有意差あり ($p < 0.05$)

β -1,2マンノースを欠損したマンナンによる免疫細胞の刺激活性を調べるため、マウス骨髄由来の樹状細胞をマンナンで刺激して、炎症性サイトカインの産生を調べた。CAUR6000株やMNN412-17株由来のマンナンと比較して、CAMN1105株のマンナンでは、IL-6及びIL23を強く誘導した（図7、8）。

次に、 β -1,2マンノース転移酵素遺伝子相補株（CAMN1301）マンナンや比較対象株（CAMN1302）マンナンで、マウス樹状細胞を刺激したところ、遺伝子相補株のマンナンでは、炎症性サイトカインIL-6、IL23の誘導能が低下していた（図9、10）。

次に、 β -1,2マンノース転移酵素遺伝子相補株（CAMN1301）マンナンや比較対象株（CAMN1302）マンナンで、マウス樹状細胞を

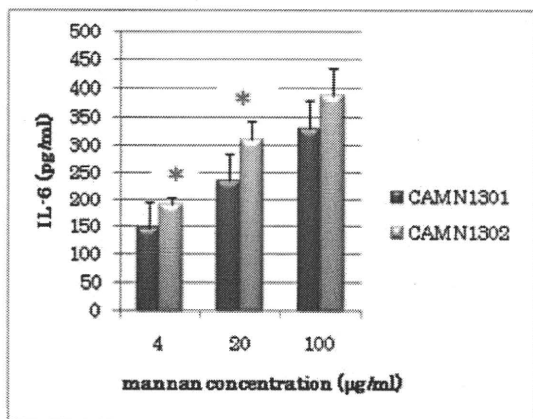


図9. β-1,2マンノース転移酵素遺伝子相補株マンナンによるIL-6産生誘導 CAMN1301、CAMN1302 間で有意差あり (p<0.05)

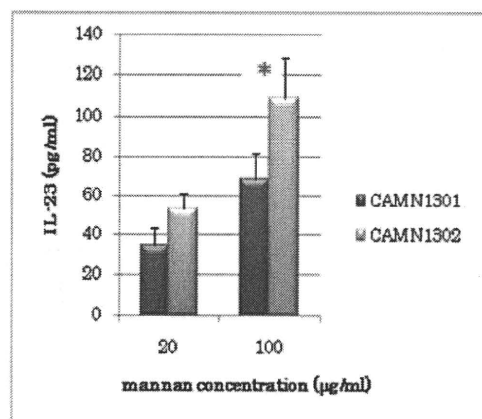


図10. β-1,2マンノース転移酵素遺伝子相補株マンナンによるIL-23産生誘導 CAMN1301、CAMN1302 間で有意差あり (p<0.05)

刺激したところ、遺伝子相補株のマンナンでは、症性サイトカインIL-6、IL23 の誘導能が低下していた (図9、10)。

D. 考察

われわれは、遺伝子工学的手法によって*C. albicans* 細胞壁表層にβ-1,2-マンノースが付加しない株を作製した。これまでにホスホマンナンとβ-1,2結合型マンノースを欠損していると推定される菌株由来のマンナン蛋白をマウスに投与すると血管炎を発症することが分かった。その原因を明らかにするために、マンナン分画を精製してマウス樹状細胞を刺激し、炎症性サイトカイン産生誘導について検討したところ、β-1,2結合型マンノース欠損株では親株と比較して産生誘導が高かった。最近、*C. albicans* のα結合型マンナンが樹状細胞などに発現するC型レクチンのDectin 2によって、認識されることが報告された。今回の研究結果により、何らかの要因で*C. albicans*表層のβ-1,2結合型マンノースが発現しない状況が生じると、内面側のα結合型マンナンが露出され、強い炎症反応が引き起こされる可能性が示唆された。

E. 結論

*C. albicans*の表層を構成するマンナンの構造の違いが、炎症惹起、血管炎発症に関与することが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Miyazaki T, Yamauchi S, Inamine T, Nagayoshi Y, Saijo T, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Yanagihara K, Miyazaki Y, Kohno S. Roles of calcineurin and Crz1 in antifungal susceptibility and virulence of *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54 (4):1639-1643, 2010.
- 2) Kinjo Y, Pei B. Glycolipid antigen-mediated invariant NKT cell activation in microbial immunity. *Curr Immunol Rev.* 6(2): 116-122, 2010.
- 3) Kaneko Y, Ohno H, Fukazawa H, Murakami Y, Imamura Y, Kohno S, Miyazaki Y. Anti-Candida-biofilm activity of micafungin is attenuated by voriconazole but restored by pharmacological inhibition of Hsp90-related stress responses. *Med Mycol.* 48(4):606-12, 2010.

学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

2. 特定疾患におけるレトロトランスポゾン及び 内在性レトロウイルスの関与

研究分担者：佐多 徹太郎（国立感染症研究所・感染病理部）

研究協力者： 徳永 研三（国立感染症研究所・感染病理部）

岩部 幸枝（国立感染症研究所・感染病理部）

研究要旨：拡張型心筋症（DCM）におけるレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与について検討するため、DCM患者心筋由来RNAを用いてReal-time RT-PCRまたはDNA microarrayによる宿主自然免疫関連遺伝子、DCM関連遺伝子、及びレトロトランスポゾン・内在性レトロウイルス遺伝子の発現解析を行ったが、いずれの遺伝子発現においても統計的に有意な差は認められなかった。今後、検体数を増やして更なる解析を試みる。またレトロトランスポゾンが特定疾患に関与する可能性を考慮し、また宿主側の防御機能を検証することを目的として、昨年度はAluレトロ転移に対する抗レトロウイルス蛋白APOBEC3ファミリーの抑制効果を見出した。本年度、APOBEC3GのAlu抑制機序について検討した結果、N末30アミノ酸が二量体形成に関与し、その領域が抗Alu活性のみならず抗LINE-1活性にも重要であることを明らかにした。

A. 研究目的

ヒトゲノムの42%を占めるレトロトランスポゾンの殆どは全く機能を有しない化石化した遺伝子であるが、non-LTR型レトロトランスポゾンLINE-1及びAlu各500,000コピー（それぞれヒトゲノムの17%、11%を占める）のうち、前者は100コピーが、後者はかなり多数のコピーが、機能的かつ完全長の形で存在している。これらのレトロトランスポゾンは幾つかの遺伝子疾患に関与する一方で、LINE-1は結腸癌、AluはB-cell lymphomaを起こす事が明らかになっていることから、レトロ転移はsomaticなレベルでも起きる可能性が示唆されてきている。我々は以前、ヒト抗レトロウイルス蛋白APOBEC3ファミリーがLINE-1レトロ転移を抑制する機能を有していることを報告し（Kinomoto et al. Nucleic Acids Res. 2007）、また昨年度までにAluレトロ転移においてもAPOBEC3ファミリー蛋白が抑制的に働くことを見出した。本年度はその抑制機序について検討する。

我が国に20万人いる慢性心不全患者の原因疾

患の約10%を占める拡張型心筋症（DCM）は、左心室内腔の拡大及び収縮不全を特徴とし、一旦発症すると難治性となる原因不明の心疾患である。遺伝子異常によるDCMは特定の心筋遺伝子（Dystrophin、Titin、Cardiac troponin T、Desmin、LAMIN A/C他）の発現不全または機能異常によることが分かっている。その原因の一つとして、近年LINE-1レトロ転移による心筋遺伝子変異が報告されていることから、本分担研究課題においては、DCMにおけるLINE-1・Aluレトロトランスポゾン及び内在性レトロウイルスの関与について検証することを目的とする。

B. 研究方法

1. 臨床検体収集：九州大学医学部に通院するDCM及び非DCM患者（それぞれ4例及び13例）より得られた心筋生検サンプルをRNA later（Ambion）に浸し4°C保存、採取後1週間以内にRNeasy Mini Kit（QIAGEN）によりtotal RNAを抽出した。

（倫理面への配慮）

国立感染症研究所・ヒトを対象とする医学研

究倫理審査委員会において、研究課題名「拡張型心筋症におけるレトロトランスポゾン・内在性レトロウイルス及び宿主自然免疫蛋白の関与についての検討」として平成21年5月11日付け承認番号187により承認を得た。また九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会においても、研究課題名「心筋症の重症度に関与する種々の因子および組織学的検討による新たな発症機転究明に関する研究」として平成21年10月20日付け承認番号377-00により承認を得た。

2. 標準曲線用スタンダードプラスミド作製：ヒト培養細胞株（HeLa、293T、H9、またはMOLT4）からRNAqueous Kit (Ambion) で抽出したtotal RNAをテンプレートにして、Internal control用のhousekeeping 遺伝子RPL27、DCM関連遺伝子（Desmin、Cardiac actin、 β -Myosin heavy chain、 δ -Sarcoglycan、Cardiac troponin T、 α -Actinin-2、 α -Tropomyosin、Phospholamban、Titin、Cypher/LIM-binding domain 3、Metavinculin、 α -Myosin heavy chain、Dystrophin、Cardiac troponin I、Tafazzin、及びLAMIN A/C）、内在性レトロウイルス遺伝子（HERV-K、HERV-H、及びHERV-W）をnested RT-PCRにて遺伝子増幅し、増幅断片をTOPO TA-cloning vector pCR4 (Invitrogen) に挿入した。各遺伝子配列はABI3130シーケンサー (ABI) により確認した。宿主自然免疫関連遺伝子8種類（APOBEC3A、3B、3C、3DE、3F、3G、3H及びBST-2）及びレトロトランスポゾンLINE-1のスタンダードプラスミドは昨年度までに作製したものをを用いた。

3. Real-time RT-PCR：段階希釈した標的遺伝子断片を含むスタンダードプラスミドとそれぞれのプライマー及びTaq-manプローブ4色（ControlはCy5、他の遺伝子はFAM、HEX、またはROX）、QuantiTect Multiplex RT-PCR (Qiagen) を用いてMx3005P (Stratagene) によるreal-time RT-PCRを行い、標準曲線のlinearityを確認した。患者検体RNAにおける、各遺伝子のmRNA発現レベルをmultiplex real-time RT-PCRにより定量し、housekeeping 遺伝子に対するRNAコピー数を算出した。

4. DNA microarrayアッセイ：DCM及び非DCM患

者心筋生検サンプルより得られたtotal RNAをIllumina TotalPrep RNA Amplification Kits (Ambion) を用いて、cDNA作製及びラベリングを行い、Illumina HumanHT-12 BeadChipによりDNA microarrayを行った。

5. Dimerization アッセイ：Mycタグ付き野生型APOBEC3G発現ベクターとHAタグ付き野生型、N末欠失変異型（-30、-60、-90、-120、-150 AA）、または二量体化不全点変異型（C97/100A）APOBEC3G発現ベクターを、FuGENE6を用いて293T細胞にコトランスフェクションした。48時間後に細胞溶解液を加えて遠心した上清を用い、抗Mycモノクローナル抗体（Sigma）による免疫沈降反応を行った。沈降物をSDS-PAGEで展開後、抗HAポリクローナル抗体（Sigma）を用いたウエスタンブロットにより、変異型APOBEC3GのDimerization活性を検討した。

6. LINE-1レトロ転移レポーターアッセイ：ネオマイシン耐性遺伝子(*neo^r*) レポーターLINE-1発現ベクターpCEP4/L1mneoI/ColE1 0.5 μ g、APOBEC3ファミリー発現ベクター0.1 μ g、空ベクター0.1 μ gを、Lipofectamin Plus (Invitrogen) を用いて2 x 10⁵個のHeLa細胞にトランスフェクションした。3日後、0.4 mg/mlのG418存在下で14日間培養、LINE-1レトロ転移の結果発現してきた*neo^r*によりG418耐性で生き残った細胞を、クリスタル・バイオレット (Merck) で固定・染色、コロニーカウントにより定量比較した。

C. 研究結果

1. DCM患者心筋生検サンプル由来RNAにおける標的遺伝子発現解析：今回新たに作製した20種類の標的遺伝子のスタンダードプラスミドを用いて、multiplex real-time RT-PCRによるmRNA発現の定量系の樹立を試みたところ、全ての遺伝子において、直線性の高い標準曲線を描くことができた。DCM及び非DCM患者の心筋生検サンプルより抽出されたtotal RNA計17検体における、レトロトランスポゾン・内在性レトロウイルス遺伝子5種類、それらを制御する宿主自然免疫関連遺伝子8種類、及びDCM関連遺伝子16種類全てのreal-time RT-PCR解析の結果、いかなる遺伝子発現においてもDCM及び非DCM患者間で統計上有意な差は認められなかった。DNA microarray

アッセイの結果もまた同様であった。

2. APOBEC3Gの抗Aluレトロトランスポゾン活性における二量体形成能の重要性： 昨年度までに、全APOBEC3ファミリー蛋白、特にAPOBEC3Gが、LINE-1のみならずAluに対しても、レトロ転移を抑制する活性を有すること、またN末30アミノ酸までが抗Alu活性に重要であることを明らかにした。引き続き本年度は、その責任領域であるN末30アミノ酸に規定される機能を探るべく、抗HIV活性に重要であるAPOBEC3Gの二量体形成能について、免疫沈降型dimerization アッセイにより検討した。その結果、N末30アミノ酸以上欠損した変異型APOBEC3Gは全て、陰性対照の二量体化不全点変異体と同様に、二量体形成能を失っていることが分かった。このことからAPOBEC3Gの抗Alu活性において、N末30アミノ酸により規定される二量体化能が重要であることが明らかになった。

3. APOBEC3Gの抗LINEレトロトランスポゾン活性における二量体形成能の重要性： 抗Alu活性に重要であるAPOBEC3Gの二量体形成能が、抗LINE-1活性においても重要か否かを検証するために、N末欠失変異型、及び二量体化不全点変異型APOBEC3Gを用いたLINE-1レトロ転移レポーターアッセイを行った。その結果、昨年度行ったAluレトロ転移アッセイの結果と全く同様に、N末30アミノ酸以上欠損したAPOBEC3G変異体は全て、レトロ転移抑制活性を失っていた。重要なことに、二量体化不全点変異体も同様に抗LINE-1活性を喪失していたことから、APOBEC3Gの二量体形成能は、Aluに対してのみならずLINE-1のレトロ転移においても必須であることが明らかとなった。

D. 考察

今回入手したDCM及び非DCM患者心筋検体において、標的遺伝子29種類のmRNA発現レベルに大きな差は認められなかったが、この限られた患者心筋検体数（DCM患者4検体、非DCM患者13検体）においてその統計的有意差の有無を決定することは困難である。それゆえ、今後は更に検体数を増やして検証していく必要性が考えられた。同時に、生検サンプルの入手が本質的に困難なDCMに限局せず、レトロトランスポ

ゾンの関与が示唆されている他の特定疾患も視野に入れて、解析対象を拡大していくことも肝要であると思われる。

昨年度報告したAPOBEC3Gの抗Alu活性及びその責任領域N末30アミノ酸について、本年度その領域の抗Alu活性における機能的意義を検証した結果、APOBEC3Gの二量体形成にはその領域が重要であることが分かった。二量体形成能は抗HIV活性にも必要であることに加え、今回の実験で、抗LINE-1活性にも必須であったことから、APOBEC3Gの二量体形成はその機能発現に不可欠な要素であると考えられた。

Aluは蛋白発現が無く、そのレトロ転移において常にLINE-1に従属するという特徴を鑑みると、（1）APOBEC3GがLINE-1蛋白との相互作用を介してAluを同時に抑える、（2）APOBEC3GがAlu mRNAとの特異的相互作用によりLINE-1にもその影響を与えている、（3）AluとLINE-1を同時にブロックしている、という3つの可能性が考えられ、これらを検証していくことは、今後の最も興味深い課題のひとつである。そうした意味において、APOBEC3Gの二量体形成によって生じるポケット部分に結合するのが蛋白か核酸かについて、今後、構造学的に解析してみることは極めて重要であろう。

E. 結論

今回解析した少数のDCM患者由来心筋細胞においては、レトロトランスポゾン・内在性レトロウイルスが原因と考えられるDCM関連遺伝子の発現異常は認められなかった。抗Alu活性に関わるAPOBEC3GのN末30アミノ酸は二量体形成に重要であった。また、その領域は抗LINE-1活性においても同じく必須であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Iwabu, Y., Kinomoto, M., Tatsumi, M., Fujita, H., Shimura, M., Tanaka, Y., Ishizaka, Y., Nolan, D., Mallal, S., Sata, T., and Tokunaga, K. Differential anti-APOBEC3G activity of HIV-1 Vif proteins derived from different subtypes. *J. Biol. Chem.* 285: 35350–35358. 2010.
- 2) Iwabu, Y., Fujita, H., Tanaka, Y., Sata, T., and Tokunaga, K. Direct internalization of cell-surface BST-2/tetherin by the HIV-1 accessory protein