

201124D32A

厚生労働科学研究費補助金
エイズ対策研究事業

**APOBEC3分子のタンパク質レベルの機能性多型を
基礎としたHIV-1複製抑制機構の分子基盤の解明**

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮澤 正顕
(近畿大学医学部)

平成24年 3月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

APOBEC3 分子のタンパク質レベルの機能性多型を
基礎とした HIV-1 複製抑制機構の分子基盤の解明

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 宮澤 正顯

(近畿大学医学部)

平成 24 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書

APOBEC3 分子のタンパク質レベルの機能性多型を基礎とした HIV-1 複製抑制機構の分子基盤の解明

研究代表者： 宮澤 正顯 1

II. 分担研究報告書

1. マウス APOBEC3 機能性多型の分子基盤解析

研究分担者： 宮澤 正顯 17

2. ヒト APOBEC3GZ2 ドメインの比較構造・機能解析

研究分担者： 高折 晃史 25

3. マウス APOBEC3 多型がタンパク質立体構造に与える影響の解析

研究分担者： 伊藤 暢聡 27

4. ヒト APOBEC3 タンパク質発現とスプライシングパターンの解析

研究分担者： 有吉 紅也 31

5. ヒト APOBEC3 遺伝子の機能性多型の探索

研究分担者： 木村 彰方 37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

45

I. 総括研究報告書

APOBEC3 分子のタンパク質レベルの機能性多型を基礎とした HIV-1 複製抑制機構の分子基盤の解明

研究代表者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

研究要旨 APOBEC3 は一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼであり、細胞内レトロウイルス複製制限因子として機能する。既存の感染性レトロウイルスは自然宿主の APOBEC3 に対抗する機能を獲得しており、APOBEC3 は異種由来レトロウイルスに対してしか効果が無いと信じられていた。実際、マウスの APOBEC3 は Vif による阻害を受けずに HIV-1 の複製を抑制できる。我々はマウス APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対して強い複製制限効果を示しうること、その遺伝子には多型があり、感染抵抗性系統で発現する対立遺伝子は転写レベルで高発現であって、第 5 エキソンを含まないこと、N-末端ドメインのアミノ酸配列が複製抑制効果を決定することを発見した。マウス APOBEC3 とヒト APOBEC3G の N-末端側 Z2 ドメインは系統発生的にもデアミナーゼ活性部位のアミノ酸配列からも相同であるから、我々の見出した Z2 ドメインの機能的アミノ酸配列多型と第 5 エキシソンの作用機構を明らかにすることで、ヒト APOBEC3G に Vif による阻害を受けない HIV-1 複製抑制能を付与する分子設計の基盤が築ける可能性がある。今年度は、抵抗性対立遺伝子産物がタンパク質レベルでも高発現であること、その理由は第 5 エキソンを欠く転写産物がこのエキソンを含む転写産物に比べて高い翻訳効率を示すためであること、抵抗性対立遺伝子の転写産物に第 5 エキソンが含まれない理由は、第 4 イントロンの RNA 分岐部位と、第 5 エキソン内部の機能的な塩基配列多型にあることを解明した。また、マウス APOBEC3 Z2 ドメインの大量発現と精製に成功し、結晶化の基礎を築いた。さらにヒト APOBEC3G Z2 ドメインの構造モデルを基にした表面アミノ酸残基の変異体解析により、R122 残基を新たな Vif との相互作用部位として同定した。一方、遺伝的解析によりヒト *APOBEC3G* 遺伝子プロモーター領域に多型の存在を確認し、近傍の連鎖不平衡を見出すとともに、個体差のあるメチル化部位を発見した。ヒト *APOBEC3* 遺伝子多型と HIV-1 感染/AIDS 発症の関連を探る新たなアジア人コホートも確立し、今後の解析の標的となる遺伝子配列と検体が確定した。

研究分担者

高折 晃史（京都大学大学院医学研究科・教授）

伊藤 暢聡（東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部・教授）

有吉 紅也（長崎大学熱帯医学研究所・教授）

木村 彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所・教授）

デアミナーゼ APOBEC3 はその一つである。哺乳類による APOBEC3 獲得後に霊長類に感染するようになったレンチウイルス群は、Vif タンパク質により APOBEC3 の細胞内分解を促進することで、標的細胞での複製阻害を回避している。しかし、自然宿主でないマウスの APOBEC3 は、Vif の有無に関わらず HIV-1 複製を強く阻害出来る。

我々はマウス APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対する生理的複製制限因子であり、自然抵抗性の異なる系統間に機能的遺伝子多型があることを、世界で初めて報告した。抵抗性対立遺伝子は転写レベルで発現量が高く、その産物は第 5 エキソンを欠損するのに対し、感受性対立遺伝子は低発現で、その産物は全長型主体である。また、両対立遺伝子産物は互いにアミノ酸配列が異なり、N-末端側が複製抑制活性を決定するが、デアミナーゼ活性部位の存在はマウスレトロウイルスの複製抑制に必須ではない。実際、感染抵

A. 研究目的

これまで実用化されて来た抗レトロウイルス薬は、ウイルス遺伝子産物そのものを標的とし、逆転写やプロウイルス組込み、或いは粒子成熟過程を阻害する。一方、強力な生物学的変異原であるレトロウイルスの染色体組込みを阻止するため、哺乳類は複数の細胞内複製制限因子を獲得して来た。一本鎖 DNA を標的とするシチジン

抗性の系統で発現するマウス *APOBEC3* 対立遺伝子の存在下でも、標的細胞に組込まれたプロウイルスに有意な G-to-A 変異の蓄積は認められない。

マウス *APOBEC3* とヒト *APOBEC3G* の N-末端側 Z2ドメインは、系統発生的にもデアミナーゼ活性部位のアミノ酸配列からも相同であるから、我々の見出した Z2ドメインの機能的アミノ酸配列多型と第 5 エキソンの作用機構を明らかにすることで、ヒト *APOBEC3G* に Vif による阻害を受けない HIV-1 複製抑制能を付与する分子設計の基盤が築けると考えられる。しかし、過去に X 線結晶構造解析が行われているのはヒト *APOBEC3G* の C-末端側 Z3ドメインのみであり、N-末端側ドメインの詳細な構造とその機能との相関は、ヒトでもマウスでも明らかでない。

本研究では、マウス *APOBEC3* Z2ドメインを大量に発現させ、ウイルス及び細胞タンパク質との相互作用を解析、その結晶化を試みるとともに、構造・機能に対する第 5 エキソンの役割を明らかにし、最終的に Z2ドメインの示すデアミナーゼ非依存性複製抑制の分子基盤を明らかにすることを最終目的とする。この目的に従って、今年度はマウス *APOBEC3* Z2ドメインの大量発現系を確立し、結晶化に必要な精製タンパク質を得ること、第 5 エキソンがタンパク質発現と機能に与える影響を明らかにすること、ヒト及びマウス *APOBEC3* と相互作用するウイルス側及び宿主細胞分子を解析すること、ヒト *APOBEC3* 遺伝子群の多型を探り、これと HIV-1 感染/AIDA 発症病態との相関を解析する系を確立することを目標とした。

B. 研究方法

1) マウス *APOBEC3* 各対立遺伝子産物タンパク質の高発現系構築

高機能型の C57BL/6 (B6) マウス由来、及び低機能型の BALB/c マウス由来 *APOBEC3* cDNA を、それぞれ T7 プロモーターの制御下においた大腸菌用の発現プラスミドを設計・構築した。発現後の精製のためにタンパク質の N 末端にポリヒスチジンタグ (His-tag) とトロンビン切断配列を付加したコンストラクトを用いた。発現用の大腸菌をこのプラスミドで形質転換し、毒性を避けるため IPTG による誘導発現を行った。

タンパク質発現の確認は精製用タグに対する抗体を用いた Western blot 法、及び SDS-PAGE で行った。

2) マウス *APOBEC3* タンパク質の精製

上記の1)で発現させたタンパク質の精製を行った。

今回大腸菌で発現させたタンパク質は精製用

の His-tag 配列を持っているため、ニッケルカラムによるアフィニティー精製が可能であるが、それだけでは X 線結晶解析のための結晶化試料としては純度が不十分であるため、イオン交換クロマトグラフィーを行い、さらに低分子の夾雑物を除くためにゲル濾過クロマトグラフィーで精製した。His-tag はその後の結晶化に不利に働くと考えられるので、上述の精製後、トロンビンによる酵素切断処理によって His-tag の除去を行った。

精製された試料は、紫外線吸収による濃度測定を指標としながら、限外濾過により、結晶化に適した濃度まで濃縮した。

得られたタンパク質試料の純度を SDS-PAGE で確認し、さらに動的光散乱法による粒子径の測定により、試料の均一性を調べた。

3) ゲノム塩基配列多型と *APOBEC3* タンパク質発現との関係の解析

ヒトでは、HIV-1 曝露非感染者と HIV-1 感染者或いは未感染健常人との間で、CD14 陽性単球における *APOBEC3G* タンパク質の発現量に有意な差があることが報告されているが、マウスの系で *APOBEC3* 遺伝子型の系統差がタンパク質発現量の差に結び付くかどうか、また感染抵抗性と *APOBEC3* タンパク質発現量、或いは細胞特異的発現との間に関係があるかどうかは明かでない。そこで、同種由来レトロウイルス感染に自然抵抗性を示す B6 マウスと感受性の BALB/c マウスとの間で、内因性 *APOBEC3* タンパク質発現量に差があるか否かを Western blot 法で解析した。また、その場合転写産物発現量の差がそのままタンパク質発現量の差に結び付くのか否かを、試験管内の転写翻訳系によって解析した。

4) マウス *APOBEC3* スプライスバリエント発現調節機構の解析

B6 マウスでは第 5 エキソンを欠く $\Delta 5$ が *APOBEC3* 遺伝子転写産物の主要なスプライスバリエントとして発現し、BALB/c マウスでは第 5 エキソンを含む全長型が *APOBEC3* mRNA の主体であることが、複数の研究グループによって繰り返し記載されている。しかし、対立遺伝子間の多型がこのようなスプライシング多型に結び付く分子レベルの機構は、これまで明かでなかった。そこで、*APOBEC3* 転写産物スプライスバリエント形成のしくみを、第 4 イントロンに存在する RNA 分岐部位多型、及びそのすぐ下流の投げ縄配列多型の機能的意義、及びそれ以外のゲノム多型の機能解析から解析した。

具体的には、プラスミドベクターを用いたミニ遺伝子スプライシングアッセイ系を用い、挿入するゲノム DNA 上で B6 マウス由来及び BALB/c マウス由来 *APOBEC3* 第 4 イントロンの配列を相互に置

換して、RT-PCR 法によりスプライシングの有無を解析した。BALB/c 型の分岐部位配列を持つ場合にスプライシングが促進されると予想されたので、QuickChange 法を用いた site-directed mutagenesis でこれら多型がスプライシング効率の決定に関与しているか否かを直接検定した。

実際はスプライシング制御が第 4 イントロンの多型のみ依存しないことがわかったので、ゲノム塩基配列多型が存在する第 4 エキソンから第 6 エキシソンの範囲について、B6 マウスと BALB/c マウスのゲノムクローンのキメラを作製し、調節部位の絞り込みを行った。その後、絞り込んだ調節部位存在範囲について欠失変異の導入及び B6 と BALB/c 配列間の相互置換を行い、B6 マウスで $\Delta 5$ が主要な転写産物となる原因を、特定の塩基配列多型として同定した。

5) マウス APOBEC3 転写調製配列の多型が持つ生理的意義の解析

上記4)によりマウス APOBEC3 遺伝子上のスプライシング調節部位が決定されたので、この配列が齧歯類の進化上どの時点で獲得されたものであるかを、複数の野生種のゲノム塩基配列を比較することで進化論的に解析し、レトロウイルス感染抵抗性の B6 型対立遺伝子がどの時点で獲得されたかを明らかにした。

6) ヒト APOBEC3G と HIV-1 Vif との新たな相互作用部位の探求

既知の APOBEC2 分子結晶構造をモデルに用いて、APOBEC3G Z2 ドメインの構造モデルを作成、DPD128-130 モチーフと同一表面に位置する Y19、Y22、R24 および R122 について、それぞれ変異体の発現ベクターを作成した。これらの変異体について、以下の実験を行った。

i) Vif との共沈実験により Vif との結合能を評価した。

ii) Vif と共発現させたときに発現が低下するか否かをイムノブロット法により評価した。

iii) 免疫沈降物の定量的 PCR により RNA 結合能を評価した。

iv) 精製ウイルス粒子に対するイムノブロット法により、ウイルスへの取り込みを評価した。

7) 霊長類 APOBEC3G 遺伝子における進化選択圧の解析

ヒト、チンパンジー、アカゲザル、マーモセットの APOBEC3G 遺伝子配列の個々のペアについて、300bp 幅の Ka/Ks 比を 30bp ずつのスライディングで算出した。

8) ヒト APOBEC3G 遺伝子多型の HIV 感染との相関解析と、プロモーター領域多型探索

黒人集団で HIV 感染後のウイルス量との関連が報告されている APOBEC3G 遺伝子第 4 エキ

ソン内の H186R 多型について、日本人 HIV 感染長期未発症患者 89 名、日本人一般健常者 282 名、インド人 HIV 感染患者 249 名、インド人一般健常者 386 名のゲノム DNA を PCR-RFLP 法でタイプングした。また、日本人健常者 10 名、インド人健常者 9 名を対象として、APOBEC3G 遺伝子のプロモーター領域 (-2838~+1) について、PCR ダイレクトシーケンス法で遺伝的多型を探索した。

9) APOBEC3 遺伝子領域の連鎖不平衡およびメチル化の検討

日本人一般健常者由来の B 細胞株 93 件について、APOBEC3 遺伝子領域(約 140.5 kb)の 43 個の SNP(rs2142833~139390)をタイプングし、これらの間の連鎖不平衡を検討した。また、この領域内の 5 か所のメチル化サイト (cg10555000, cg25883868, cg00399895, cg17972162 および cg13306870) について、93 のヒト細胞株におけるメチル化の程度を評価した。

10) 北ベトナムにおける HIV 感染者およびその配偶者に関する臨床疫学研究

バクマイ病院は、北ベトナムハノイ市に位置する、病床数 2,078 の北ベトナム最大の総合病院である。2009 年 10 月 26 日に同病院感染症病棟(病床数 72 床)において、HIV 外来が開設され、同病院で唯一抗 HIV 薬治療、日和見感染症に対する予防・治療が提供される診療科(感染症内科)として機能している。この HIV 外来開設以来、2009 年 10 月 26 日より 2010 年 12 月 31 日までの 14 カ月間に同外来を受診した、15 歳以上のすべての HIV 感染者を対象に、調査票を用いて臨床・疫学情報(年齢、性別、職業、教育レベル、結婚歴、パートナーの HIV 感染有無、抗 HIV 薬治療開始の有無、感染ルート、日和見感染症罹患状況、検査データ)を後ろ向きに収集した。

11) 統計解析手法

10)で収集したデータは、コード化され、Access 2007 プログラムを用いてデータ入力およびデータ処理をした。データの統計解析には、STATA version 10.0 を用いた。カテゴリー変数については、 χ^2 乗検を用い、また、連続変数の比較は、ノンパラメトリックテスト(Wilcoxon Rank-Sum test)を用いた。さらに logistic regression により、リスク因子解析を単変量および多変量解析を行った。

【倫理面への配慮】

宮澤、伊藤、高折の研究計画にはヒト検体を用いた解析を含まないが、一部に動物実験(動物からの検体採取)及び遺伝子組換え実験を含む。動物実験の実施については、近畿大学動物実験委員会による、また遺伝子組換え実験の実施についてはそれぞれの所属機関の遺伝子組換え実験

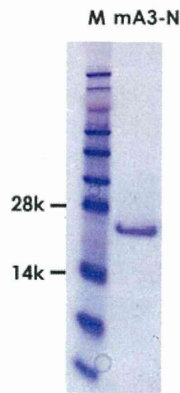


図1. 精製後のマウス APOBEC3 N-末端ドメインの SDS-PAGE (M: 分子量マーカー)

安全管理員委員会による承認を得て、必要な疼痛防止或いは拡散防止措置の下で実施した。

木村の研究計画に関わるヒトゲノム遺伝子解析研究は、東京医科歯科大学難治疾患研究所倫理審査委員会に研究計画を申請し、審査を受けた後、研究機関長による実施承認を受けた：研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関わる研究」(実施責任者 木村彰方、平成18年7月6日付承認、平成23年7月19日付部分変更承認、承認番号2011-002号)。また、有吉の研究計画については、患者情報を保護するために、病院が診療録から収集したデータ(氏名や病院IDが含まれる)から、新規の個人IDを付与し匿名化して改めてデータを抽出する方式を採った。この際、将来の研究に備え連結可能としたが、連結表はバクマイ病院情報管理者によって厳重に管理することとした。住所は個人が特定できない程度の市や県など地域のみを集めた。データ全体は、限られたコンピューターでのみ扱い、パスワードで漏えいを予防した。有吉の実施については、長崎大学熱帯医学研究倫理委員会より許可を得た(平成22年11月16日申請、平成23年1月13日承認、承認番号:10122259)。

C. 研究結果

1) マウス APOBEC3 N-末端ドメインの大量発現

今回設計した発現プラスミドにより、T7 プロモーターの制御下での IPTG による誘導によるマウス APOBEC3 タンパク質発現が、SDS-PAGE によって確認された。発現誘導後 37°C で培養を続けた場合には、タンパク質はほぼすべて不溶画分に見られた。そのため、発現誘導後の培養を低温で行うことで、可溶性形でのタンパク質発現を得た。

発現量は全タンパク中で顕著となるほどではな

いものの、SDS-PAGE ゲルの CBB 染色で視認できる程度のものであった。また、抵抗性 B6 型 N-末端ドメインの方が、感受性型の同一ドメインよりもやや発現量が多かった。

2) マウス APOBEC3 N-末端ドメインの精製と動的散乱実験による解析

発現されたマウス APOBEC3 タンパク質は、ただちにニッケル樹脂カラムによる粗精製を試みた。His-tag をもつ N-末端ドメインは想定どおりにニッケル樹脂カラムに特異的に吸着し、粗精製を行うことができたが、カラムからの溶出後、比較的短時間で沈澱してしまった。そこで様々な溶媒条件を試した結果、イオン交換クロマトグラフィーを適用するまで可溶性状態を保つ条件を見つけることができた。

イオン交換クロマトグラフィーでの精製後は、可溶性はやや改善され、ゲル濾過クロマトグラフィーでの低分子夾雑物の除去も問題なく行われ、SDS-PAGE ではほぼ単一バンドとなる試料の精製に成功した(図1)。

クロマトグラフィーにより精製された試料は、限外濾過による濃縮で、5mg/ml 以上の濃度とすることができ、高純度・高濃度の N-末端ドメイン試料を得ることができた。

動的散乱実験による粒子径の測定では、精製された N-末端ドメイン試料が、ほぼ単一の粒子径分子から構成される単分散状態 (monodisperse) であることが示唆された(図2)。さらに、タンパク質の形を球状と仮定した場合、測定された粒子径から想定されるタンパク質の分子量が 50kDa 強であることがわかった。

3) ゲノム塩基配列多型と APOBEC3 タンパク質発現との関係の解明

マウス APOBEC3 の遺伝子多型がタンパク質発現量に影響を与えるか否かを解析するため、APOBEC3 mRNA が高発現でマウスレトロウイルスに感染抵抗性である B6 マウスと、mRNA 低発現で感染感受性の BALB/c マウスの脾細胞を用い、Western blot 法で内因性 APOBEC3 タンパク

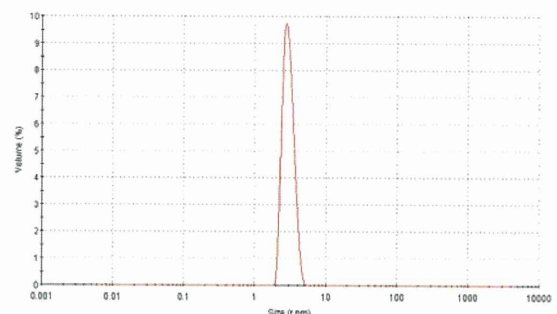


図2. 動的散乱法によるマウス APOBEC3 N-末端ドメイン試料の粒子径分布の測定結果

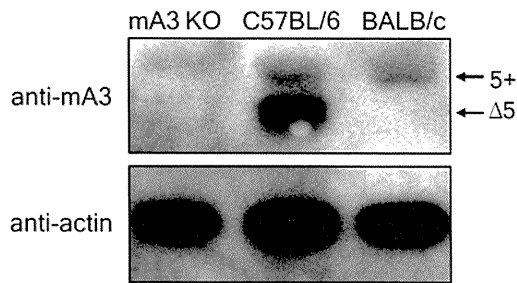


図3. 脾細胞における内因性マウス APOBEC3 (mA3) タンパク質の発現 APOBEC3 ノックアウトマウス(m3KO)を陰性対照として用いた。

質の発現量を比較した。その結果、B6 マウスの脾臓から大量の $\Delta 5$ 型タンパク質が検出されたのに対し、BALB/c マウスにおける APOBEC3 タンパク質発現は微量であることが明らかとなった(図3)。そこで、遺伝子多型に伴う転写産物発現量の差が、そのままタンパク質発現量の差に結び付くか否かを解明するため、試験管内転写翻訳系を用いた実験を行った。同じ B6 由来、または BALB/c 由来 APOBEC3 対立遺伝子の産物である全長型と第 5 エキソン欠損型の cDNA を、それぞれトランスフェクションし、ほぼ等量の mRNA 発現を得た条件下でも、細胞内の APOBEC3 タンパク質発現量は第 5 エキソン欠損型の方が明らかに高く、全長型のタンパク質は大量に発現させることが困難であった。そこで、ルシフェラーゼ発現ベクターを cotransfect することでトランスフェクション効率を厳密に検定出来る条件下で、更に real-time PCR による APOBEC3 mRNA 発現の定量も行っており、転写産物量が一定の条件でタンパク質翻訳効率を比較した。その結果、対立遺伝子間のゲノム塩基配列多型に関わらず、全長型のマウス APOBEC3 mRNA は翻訳効率が低く、少量のタンパク質しか発現しないこと、これに対し $\Delta 5$ 型の mRNA はより効率的に翻訳される結果大量のタンパク質が発現すること、両アイソフォーム間でタンパク質の安定性に差はないことが明らかになった。

4) マウス APOBEC3 スプライスバリエント発現調節機構の解明

マウス APOBEC3 遺伝子には系統間の多型があり、レトロウイルス感染抵抗性の系統は第5エキソンを欠損する $\Delta 5$ トランスクリプトを高発現するが、感受性系統は第 5 エキソンを含む全長型 mRNA を低レベルで発現する。本研究開始以前にマウス APOBEC3 遺伝子の第 4 エキソンから第 5 エキシソンのゲノム塩基配列を B6 マウスと BALB/c マウスで比較し、第 4 エキソン 3'-末端のドナー配列には多型が無いこと、一方第 5 エキソ

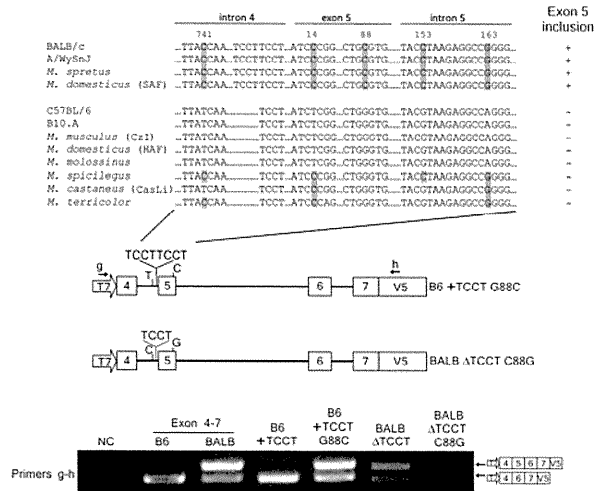


図4. マウス APOBEC3 第 5 エキソン周辺のゲノム塩基配列多型と mRNA への第 5 エキソン取り込み 上段は実験室系のマウスと複数種の野生マウスにおける第 5 エキソン周辺のゲノム塩基配列と、cDNA 解析による第 5 エキソン発現の有無をまとめたもの。野生種マウスの種名の後にある括弧内の名称は、それぞれの捕獲地を反映する。下段はゲノム DNA クローンをを用いた試験管内でのスプライシング実験の結果。

ン上流については、アクセプターサイトそのものに多型はないものの、その約 30 塩基対上流までの範囲に 4 塩基対の挿入/欠失多型と一塩基置換が存在することを見出していた。当該アクセプター配列上流部は、一次転写産物の分岐部、及び投げ縄配列として報告されているものと一致しており、その多型がスプライシング効率を左右している可能性があった。

この予測が正しいかどうかを検討するため、B6 及び BALB/c 由来 APOBEC3 遺伝子ゲノムクローンをを用い、試験管内スプライシング実験を行った。その結果、RNA 分岐部位の T/C 多型は第 5 エキシソンの取り込みに全く影響を与えないこと、polypyrimidine tract を含む投げ縄構造中の TCCT 反復数は、スプライシング効率に多少の影響を与えるが、第 5 エキソン取り込みの有無を決定的に変えるわけではないことが明らかとなった。

マウス APOBEC3 mRNA への第 5 エキソン取り込みの有無が、第 4 イントロン下流の分岐部位多型では決まらないことがわかったので、スプライシング制御部位探索の範囲をさらに下流の第 5 エキソンから第 5 イントロンに拡大した。第 5 イントロンの deletion mutants と相互入れ替えキメラから、第 5 エキソンを含む第 5 イントロン上流部がスプライシング効率決定に重要なことがわかった。そこで、絞り込まれた最小範囲内に存在する 4 つの単一塩基多型 (SNPs) について、B6 由来および

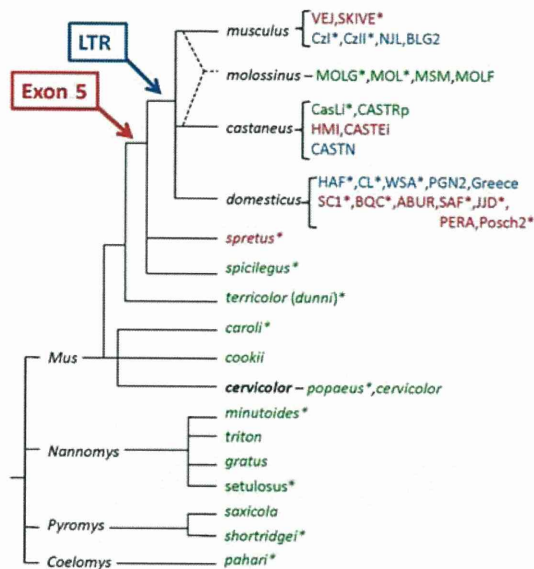


図5. 齧歯類における *APOBEC3* 遺伝子多型の進化系統樹 緑で示す種は、*APOBEC3* 遺伝子転写産物が第5エクソンを含まず、第2イントロンへの内在性レトロウイルスLTRの組込みもない、祖先型の遺伝子型を有する。赤の矢印で示す時点で、一部の個体群に第5エクソンを発現する現存のBALB/c型の遺伝子多型獲得が起こり、*M. musculus*, *M. castaneus* と *M. domesticus* の一部、及び *M. spretus* (赤文字) がそれを受け継いでいる。その後、別の個体群が第2イントロンへの LTR 組込み(青)を受け継ぐようになった。

BALB/c 由来対立遺伝子クローン間で相互置換を行った結果、驚くべきことに第5エクソン内のG/C SNPが、単独でこのエクソンのmRNAへの取り込みを制御していることが明らかとなった。実際、第5エクソンから第6エクソンを含むB6由来のゲノムクローンで、第5エクソン中の上記SNPをB6型のGからBALB/c型のCに置換すると、mRNAに第5エクソンが取り込まれた。さらに、第4エクソンから第7エクソンを含むB6由来のゲノムクローンで、上記第5エクソンのSNPをBALB/c型のCに置換し、同時に第4イントロン末端部にTCCT反復を追加すると、BALB/c由来ゲノムクローンの場合と全く同じ効率で、mRNAへの第5エクソン取り込みが起こった(図4)。

5) マウス *APOBEC3* 転写調製配列の多型が持つ生理的意義

見出した *APOBEC3* 遺伝子転写産物スプライシング制御部位多型の進化論的意義を、齧歯類の複数種と野生マウスのゲノムクローニング、及びcDNA解析により検討した(図4)。

極めて意外なことに、現存野生種と実験室系

統を含めて、調べたハツカネズミ属の全ての亜属が、原則としてB6マウスと同様に第5エクソンを取り込まない遺伝子型を有していた。しかも、スプライシング制御に重要な二つの多型である第5エクソン内のG/C SNPがGであることと、第4イントロン末端部にTCCT配列の反復が無いことは、必ず連鎖しており、機能的に無関係な多型、例えば最初RNA分岐部多型と目されていたTCCT反復上流のT/C SNPについては、連鎖は認められなかった。

ハツカネズミ属がヒトと共生するようになって生じた"house mice"の4つの種のうち、*Mus molossinus*を除く3種と、*Mus spretus*では、調べた一部の個体で、*APOBEC3* 遺伝子転写産物に第5エクソンを取り込む型の多型が見出され、それらの個体のゲノムでは、例外なく第4イントロンのTCCT反復と第5エクソンのG/C多型がCであることが連鎖していた。一方、第5エクソンを発現しないB6型の対立遺伝子を持つ個体も、*M. musculus*, *M. domesticus*, *M. castaneus* にそれぞれ複数認められ、*M. musculus* と *M. domesticus* では、これら第5エクソンに関するB6型多型を持つ個体の第2イントロンに、B6同様内在性レトロウイルスLTRの組込みが認められた。一方、*M. castaneus*の一部と、調べた *M. molossinus* の全ての個体では、第5エクソンの取り込みもLTR組込みもない、祖先型の遺伝子型が見られた。

従って、ハツカネズミ属の祖先から *M. spretus* が分岐した段階で、第5エクソンを取り込むBALB/c型の多型が獲得され、それが"house mice"にも伝えられた一方、"house mice"の種が分岐する前の段階で、一部の個体に *APOBEC3* 遺伝子座への内在性レトロウイルス組込みが生じ、*M. musculus* と *M. domesticus* の両種は、 $\Delta 5$ を祖先型よりも更に高く発現するLTR組込み(B6)型と、翻訳効率が低下する第5エクソン取り込み(BALB/c)型の、何れかの遺伝子型を持つようになったと考えられる。

更に、*M. musculus* と *M. domesticus* について、それらの持つ二つの対立遺伝子(LTR組込みのある $\Delta 5$ 型か、第5エクソン発現型か)の地理分布を纏めたところ、タンパク質発現量が著しく低下する第5エクソン発現型対立遺伝子を持つ個体が、西ヨーロッパ及び北アフリカの広い範囲に分布していることがわかった。これに対し、 $\Delta 5$ 高発現型の対立遺伝子を持つ個体の分布は、東ヨーロッパに限られていた。従って、齧歯類の祖先は第5エクソンを欠くタンパク質高発現型の *APOBEC3* 遺伝子を持っていたこと、ハツカネズミの祖先の一部で、第2イントロンに内在性レトロウイルスLTR挿入が起こり、この遺伝子の転写効率が増加したこ

と、一方ハツカネズミの祖先の一部では第 5 エキソンを含むようになる遺伝子変異が生じ、この遺伝子型を持つ個体の子孫が現在ユーラシア大陸に広範に分布していること、そしてこの遺伝子型がレトロウイルス感染感受性の BALB/c マウスへと受け継がれていることが明らかとなった。

6) ヒト APOBEC3G 変異体と HIV-1 Vif との結合

R122A および R122E 変異体は HIV-1 Vif とほとんど結合せず、Vif との共発現でも発現の低下がなかった。一方、これらの変異体は RNA との結合能は維持されており、ウイルス粒子にも取り込まれることが確認された。

7) 霊長類 APOBEC3G 遺伝子における進化選択圧の解析

ヒト、チンパンジー、オランウータン、アカゲザル、マーモセットのゲノム配列データベースから免疫・炎症関連遺伝子をピックアップして比較ゲノム解析を行った結果、APOBEC3G を含む 11 種類の遺伝子が霊長類において有意に進化速度が速いことが示された。特に、APOBEC3G 遺伝子は、ヒトの系統で非同義置換が同義置換に比較して有意に多い (Bn/Bs 比が有意に高く偏移している) ことから、強い選択圧を受けているものと考えられた。

さらに、APOBEC3G 遺伝子内の選択圧を検討するために、300bp のウインドウ中の Ka/Ks 比 (領域内の非同義置換と同義置換の比) を計算したところ、図 6 に示す通り、Vif 結合領域である active site-1 で非同義置換率が高く、選択圧の存在が資されたが、ヒト・チンパンジー系統とアカゲザル (旧世界ザル) 系統では、選択圧のかかる領

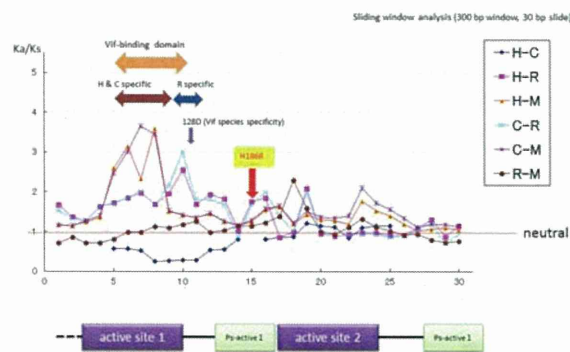


図 6. 霊長類 APOBEC3G 遺伝子の進化選択圧 ヒト (H)、チンパンジー (C)、アカゲザル (R)、マーモセット (M) の APOBEC3G 遺伝子配列比較から 300bp ごとの Ka/Ks 比をプロットした。Ka/Ks=1 (neutral) を赤点線で示す。また、Vif 結合ドメイン、ヒト・チンパンジー系列での選択領域、アカゲザルでの選択領域、および H186R の位置を図中に合わせて示した。

表 1. APOBEC3G プロモーター領域多型

rs	rs4820366	rs11713475	rs11318772	rs113442814	rs12158029	rs5592521	rs6318165	rs7281971	rs6318166	rs7297463	H186R
position	39470223	39470405	39470495	39470524	39471456	39471652	39471664	39471924	39471927	39472465	39472468
Japanese	G/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	G/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/T	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	C/C	A/A
	G/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/A	G/A	C/C	C/C	G/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	C/C	A/A
	G/A	C/T	G/T	C/T	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	G/C	A/G
	G/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	G/C	A/A
	A/A	ND	ND	C/C	C/C	G/G	G/A	G/A	C/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	A/A	G/A	A/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	G/A	A/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	C/C	A/A
Indian	ND	ND	ND	C/C	C/T	G/G	G/A	ND	ND	ND	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	ND	ND	A/A	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	G/A	A/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	A/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	A/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	A/A	G/A	G/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	G/A	A/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	A/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	A/A	C/C	A/A
	G/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	G/C	A/A

域が異なっていた。また、黒人において HIV 感染抵抗性と関連することが示された H186R 多型は、旧世界ザルにおいて選択を受ける領域に位置した。

8) APOBEC3G 遺伝子多型の探索

日本人およびインド人の HIV 感染者と一般集団について、H186R 多型頻度を検討したところ、186Arg 陽性者頻度は HIV 感染者、対照ともほぼ同一であり、明確な関連は観察されなかった。なお、インド人には H186R 多型は存在しないと報告されているが、日本人より少ないものの、低頻度ながら存在していることが判明した。

ついで、日本人 10 名、インド人 9 名を対象として、APOBEC3G 遺伝子の上流約 3kb の範囲における多型を検索した。その結果、表 1 に示すとおり、日本人集団で 9 か所、インド人集団で 6 か所の多型を確認したが、いずれも既知の多型であった。また、これらのうち日本人、インド人で共通する多型は 5 か所であった。

これらのプロモーター SNP と H186R 多型とを合わせて考えると、rs113442814 と H186R は連鎖不平衡にあることが示唆された。さらに、観察されたプロモーター多型が転写因子の結合サイト内に存在する可能性を検討したところ、rs4820366、rs11318772、rs113442814、および rs12158029 は、それぞれ MZF1、GATA-3、CP2、および p300 の結合配列内の可能性が示された。

9) APOBEC3 遺伝子領域の連鎖不平衡およびメチル化の検討

APOBEC ファミリーはクラスターをなして存在するが、ヒトでは APOBEC3A、APOBEC3B、APOBEC3C、APOBEC3DE、APOBEC3F、APOBEC3G、APOBEC3H が第 22 染色体長腕上にマップされる。そこで、日本人由来の 93 種類の B 細胞株で APOBEC3G 遺伝子周辺約 140kb に渡る領域内の 43 個の SNP をタイピングし、連鎖不平衡ブロック構造を検討した。その結果、図 7 に示すとおり、APOBEC3F、APOBEC3G および APOBEC3H は同じ連鎖不平衡ブロック内に存在することが判明した。さらに、この領域内の 5 か所の CpG サイト (図 7) について B 細胞株におけるメ

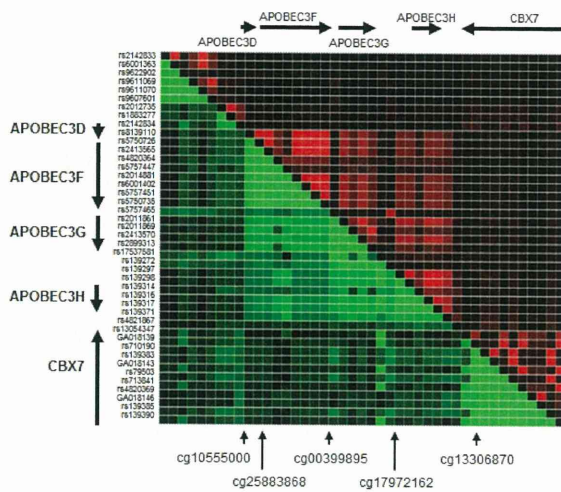


図7. APOBEC3 領域の連鎖不平衡ブロック構造 D' (右上)および r^2 (左下)を、高値ほど明るい色調となるように示した。領域内の遺伝子名と転写方向を矢印で示した。また、図の下には5か所の CpG サイトを示した。

チル化の程度を検討したところ、細胞間差(個体差)が存在することが判明した。APOBEC3G 周辺の cg25883868, cg00399895, cg17972162 では、それぞれのメチル化頻度が 0.254-0.602、0.095-0.896、0.056-0.814 であり、大きな個体差が観察された。また、同一連鎖不平衡ブロック内にある cg10555000 は 0.907-0.918 と強くメチル化されており、一方 CBX7 遺伝子を含む連鎖不平衡ブロック内の cg13306870 でも 0.013-0.759 と大きなメチル化の個体差を認めた。

10) バクマイ病院における HIV 感染者の疫学的特徴

2009年10月26日より、2010年12月31日までの期間に、合計390名の患者が北ベトナム・バクマイ病院 HIV 外来を受診し、そのうち387名(99.2%)から、情報を収集した。HIV 感染者の臨床疫学的背景は、6割以上が男性であり、男性 HIV 感染者のうち55%が静注麻薬使用者(Injecting Drug User, IDU)であった。IDUは、ほぼ全例男性であった。さらに、C型肝炎ウイルス(HCV)感染率が、B型肝炎ウイルス(HBV)感染率より高く、IDUとHCV感染との間に強い相関があった($p < 0.001$)。

非常に興味あることに、男性が HIV 感染者であった場合、その配偶者における HIV 非感染の割合はほぼ半数で、その割合が非常に高かった。一方、女性 HIV 感染者における HIV 非感染配偶者の割合は、12%と極めて低く、これは、殆どの夫婦で男性が HIV 感染のインデックスケースであることを反映していると考えられた。

11) ベトナムコホート HIV 感染者の臨床的特

徴

6割の感染者において、CD4細胞数は200細胞/ μ l以下であり、約4割が既にエイズに進行していた。特に男性でエイズに進行している患者の割合が多く、CD4細胞数も男性群において有意に低かった。HIV感染者の日和見感染症の内訳は、結核が最も頻度の高い日和見感染症であり、次に帯状疱疹・カンジダ性口内炎・ペニシリオーシスが多かった。北タイで頻度の高いニューモシスチス肺炎やクリプトコッカス髄膜炎は、5%以内であった。

さらに、結核罹患に対するリスク因子解析を行ったところ、高年齢層(30歳以上)、IDU歴、失業状態と結核罹患との間に、それぞれオッズ比が2.0, 1.8, 2.1であり、約2倍のリスクがあることが判明した。また、予想したとおり、CD4細胞数が200/uL以上の群に比べて、CD4細胞数が50-200, 50/uL以下の群が、約5倍のリスクがあることが判明した(各々のオッズ比 5.7, 4.6; $p < 0.001$)。

12) 配偶者へ HIV を伝播した男性 HIV 感染者の臨床疫学的特徴

前述のとおり、ベトナムでは、男性 HIV 感染者がインデックスケースである場合がほとんどである。そこで、男性 HIV 感染者の特徴を、その配偶者の HIV 感染有無によって2群間に別け、比較した。その結果、HIV 感染した配偶者をもつ男性 HIV 感染者は、HIV 非感染配偶者をもつ男性 HIV 感染者より、有意に若いことが判明した。しかし、CD4細胞数や臨床病期との間には相関はなかった。一方、非常に興味深いことに、HIV 非感染配偶者をもつ男性 HIV 感染者は、HIV 感染した配偶者をもつ男性 HIV 感染者に比べて、IDU歴があるものが多い傾向が見られた。IDU使用歴は、感染者本人の口述による分類であるが、実際に使用歴がある患者よりも少ない可能性が十分ある。そこで、口述による IDU 罹患と非常に強い相関のある HCV 感染を IDU 使用歴の指標と仮定したところ、非常に興味あることに、男性 HIV 感染者における HCV 重複感染と配偶者の HIV 非感染との間に統計的に有意な相関があることが判明した($p = 0.006$)。

D. 考察

今年度は、マウス APOBEC3 N-末端ドメインを大腸菌内で可溶性形で発現させることに成功した。発現量は、大腸菌の全タンパク質に対して極めて顕著というものではなかったが、構造解析の試料としては十分なものであった。

また、動的光散乱法実験による粒子径測定により、今回得られた試料は単分散(mono-disperse)であり、非特異的な凝集などがないことが示唆さ

れた。一方、同実験で得られた粒子径から見積もられた N-末端ドメイン試料の分子量は 50kDa 強であり、今回の発現コンストラクトがタグ等を含めておよそ 24kDa であることから、マウス APOBEC3 の N-末端ドメインが、溶液中で二量体として存在していることが示唆された。これが生物学的な意義を持つのか、あるいは本来、N-末側と C-末側の2つのZドメインからなる APOBEC3 を一つのドメイン単体で発現させたための人為的な現象であるのかは、現段階では不明である。

同一の APOBEC3 対立遺伝子の産物である全長型の cDNA と $\Delta 5$ cDNA をそれぞれトランスフェクションし、ほぼ等量の mRNA 発現を得ても、細胞内のマウス APOBEC3 タンパク質発現量及び出芽するウイルス粒子への取り込み量は $\Delta 5$ の方が明らかに高く、全長型のタンパク質は大量に発現させることが困難であることが以前から経験されていた。今回、mRNA 発現量が同等であっても全長型のマウス APOBEC3 mRNA は翻訳効率が低く、少量のタンパク質しか発現しないこと、これに対し $\Delta 5$ mRNA はより効率的に翻訳される結果大量のタンパク質が発現することが明らかとなった。実際、生体内での内因性 APOBEC3 タンパク質発現量も、 $\Delta 5$ が主体である B6 マウスでは、全長型が主体の BALB/c に比較して、数倍高かった。このことから、APOBEC3 発現がタンパク質レベルで高くなれば、レトロウイルス感染に対する抵抗性を発揮するのではないかと予想される。マウス APOBEC3 の発現量とその抗ウイルス活性を左右することは、Susan Ross らが試験管内及び生体内の発現誘導実験によって証明している。また、最近同様の報告がアカゲザルを用いて SIV に対してなされており、そこでは Vif を発現する野生型 SIV の生体内複製に対しても、APOBEC3G/F の発現誘導が防御効果を示している点が注目される。我々も以前に、イタリアコホートの HIV-1 曝露非感染者におけるヒト APOBEC3G の発現を HIV-1 感染者や未感染健常者と定量的に比較し、曝露非感染者では、特に試験管内での I 型インターフェロンによる刺激後に、CD14 陽性単球での APOBEC3G 発現が HIV-1 感染者や対照健常人に比べ著しく高まることを報告している。従って、今回見出した第 5 エキソン取り込みの有無によるタンパク質翻訳効率の違いは、APOBEC3 タンパク質の高発現による HIV-1 感染抵抗性誘導を考える上で重要な知見である。

第 5 エキソン内のたった一つの SNP が、APOBEC3 遺伝子転写産物のスプライシングの有無を決定している機構は現時点では不明であるが、一つの可能性として、第 5 エキソンコード部分の RNA がステムループ構造を形成しており、そ

の安定性がこの SNP によって大きく影響されるのではないかと考えられる。

マウス APOBEC3 遺伝子に高機能の B6 型対立遺伝子と低機能の BALB/c 型対立遺伝子を見出した時、我々が最初に予想したのは、B6 マウスの祖先は第 5 エキソンを失うような遺伝子多型を獲得することでマウスレトロウイルスに感染抵抗性となり、進化上の優位性を得たのであろうということであった。ところが実際には、齧歯類の祖先は、第4イントロン末端部と第5エキソン内部に第 5 エキシソンの mRNA への取り込みを欠くような連鎖する塩基配列多型を有しており、これが現存の B6 マウスの祖先を含むハツカネズミ集団へとそのまま受け継がれていることが明らかとなった。このことは、現存ハツカネズミの祖先では第 5 エキソンが発現しないこと、即ち APOBEC3 タンパク質が高い効率で翻訳されることが生理的に重要な形質であり、それを保証する遺伝子型に対して正の選択圧が加わっていたことを示唆する。実際、ハツカネズミの祖先では、翻訳されない第 5 エキシソンの塩基配列に選択圧が加わっていなかった証拠があり、インド北部からベトナムに分布する *Mus cervicolor* やセネガル・エチオピア・ケニア西部に分布する *Mus setulosus*、及びラットでは、第 5 エキソン中にフレームシフトが認められる。このことから、全く意外なことに、現存の BALB/c マウスの祖先は、翻訳効率低下により APOBEC3 タンパク質が低発現となるような、第 5 エキソン取り込み型の遺伝子型を獲得し、保持し続けていると考えられる。

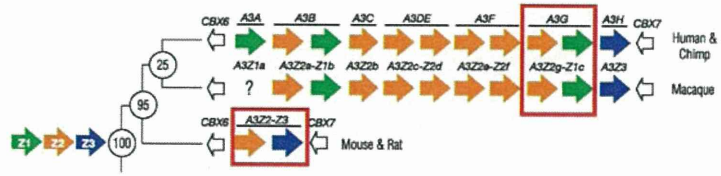
ヒト APOBEC3 Z2 ドメインの R122 残基は、Vif との結合部位のひとつであることを発見した。一方、この部位は RNA との結合やウイルス粒子への取り込みには関与しないことがわかった。R122 は D128 や R24 と同様に Vif との結合に関与しており、この部位をブロックするような薬剤が HIV-1/AIDS の新しい治療薬となる可能性がある。

霊長類の APOBEC3G 遺伝子が進化上強い選択圧を受けていることが明らかとなった。強い選択圧がかかる領域は Vif 結合ドメインであったことから、APOBEC3G 遺伝子の進化において SIV の存在が関わっていたことが示唆される。また、HIV 感染後のウイルス量との関連が報告されている H186R 多型は、Vif 結合ドメインにはないが、旧世界ザルでの選択圧がかかった領域内にマップされたことから、Vif とは異なるメカニズムでの選択が存在したものと考えられる。一方、H186R 多型の頻度は日本人、インド人ともに HIV 感染者と対照群でほぼ同程度であった。これは、H186R が HIV 感染感受性には直接関連しないことを示唆する。

今年度ヒト APOBEC3 遺伝子領域内の3つの遺伝子が同一の連鎖不平衡ブロック内に存在するこ

背景

- ・マウスAPOBEC3はVifに阻害されずにHIV-1複製を抑制出来る
- ・マウスAPOBEC3にはN-末端側に機能性のアミノ酸配列多型がある
- ・マウスAPOBEC3のZ2ドメインはヒトAPOBEC3GのZ2ドメインと相同である



目的

- ・マウスAPOBEC3のN-末端多型とsplice variantsがその機能を異にする仕組みを構造面から明らかにして、Vifに阻害されずにヒト細胞内でHIV-1の複製を抑制するための分子設計の基盤データを得る

資源

- ・機能性の異なるマウスAPOBEC3対立遺伝子と変異体発現ベクター(宮澤ら)
- ・ヒトAPOBEC3G発現ベクターとタンパク質構造情報(高折ら)
- ・タンパク質構造解析の技術(伊藤ら)
- ・APOBEC3安定発現細胞株(宮澤ら)
- ・ヒトAPOBEC3遺伝子座のゲノム解析情報(木村ら)
- ・HIV-1感染者および曝露非感染者の凍結末梢血単核球検体(RNA、タンパク質の解析可能)(有吉ら)

平成23年度の成果

- ・APOBEC3対立遺伝子とその変異体の産物が結合するHIV及び細胞側標的分子の同定(宮澤、高折)→[ウイルスプロテアーゼ及びゲノムDNAが標的となる可能性](#)→[プロテアーゼとの結合の直接証明](#)へ
- ・機能性の異なるマウスAPOBEC3対立遺伝子及びそれら変異体産物の立体構造解析(伊藤、宮澤)→[可溶性N末端ドメインの大量発現・精製に成功](#)→[結晶化とX線構造解析](#)へ
- ・APOBEC3 splice variantsの転写・翻訳制御機構と立体構造の解析(宮澤、伊藤)→[exon 5が翻訳に与える影響と、スプライシング制御部位多型の進化の解明](#)
- ・ヒトAPOBEC3 splice variantsの探索とHIV感染病態との相関解析(有吉、木村)→[プロモーター部位多型の発見](#)→[タイコホート凍結検体の解析](#)へ

とが判明した。このことは、APOBEC3F、APOBEC3GおよびAPOBEC3Hが、互いに関連しつつ多様性を形成したことを示唆する。

今回、ベトナムコホートで、HIV非感染の配偶者をもつ男性HIV感染者は、HIV感染の配偶者をもつ男性HIV感染者より結婚歴が有意に長いことが判明した。両者の間で性的接触回数やコンドームの非使用頻度に差はなく、ベトナムバクマイ病院でリクルートしたHIV非感染配偶者群は、かなり長期間、相当の頻度でHIVに暴露されたにもかかわらず感染していない、HIV感染に何らかの生物学的抵抗性を有する集団であると考えられた。従って、今後これらのHIV暴露非感染集団が、本研究における遺伝的解析の新たな対象集団として適切であると考えられる。

E. 結論

マウスAPOBEC3のアミノ端側ドメインを、T7プロモーターを用いて大腸菌で可溶性形で発現させることができた。得られたタンパク質は、ニッケル親和性、イオン交換、ゲル濾過の3種類のクロマトグラフィーにより、高度に精製をすることができた。精製したN-末端ドメイン試料は、構造解析に適した高純度・高濃度であり、動的光り散乱実験から得られた粒子径の分布も均一であった。

ヒトAPOBEC3 Z2ドメインに、新たなHIV-1 Vif結合部位としてR122を発見した。この残基はRNAとの結合やウイルス粒子への

取り込みには関与しないことがわかり、この部位をブロックするような薬剤がHIV-1/AIDSの新しい治療薬となる可能性がある。

生理的な同種以来レトロウイルス複製制限因子であるマウスAPOBEC3の、機能的遺伝子多型について、研究目標の一つである第5エクソンの機能的意義を解明した。即ち、レトロウイルス感染抵抗性のB6マウスが発現する対立遺伝子は、その第5エクソン内部及び第4イントロン末端部に存在する互いに連鎖したスプライシング制御部位多型のため、その転写産物が第5エクソンを欠く。第5エクソンを欠く転写産物は、これを含む全長型と比較して翻訳効率が高く、より大量のAPOBEC3タンパク質を発現する。このタンパク質発現量の差は、脾細胞における内因性APOBEC3タンパク質量の差にそのまま反映される。第5エクソンを欠く転写産物が高い翻訳効率を示す理由は、恐らくmRNAの二次構造の安定性の差によるものと考えられる。

齧歯類におけるAPOBEC3遺伝子の系統発生的解析から、祖先型の遺伝子は第5エクソンを含まないタンパク質高発現型であったと考えられ、この祖先型遺伝子に内在性レトロウイルスの組込みが生じた結果、感染抵抗性である現存のC57BL/6型の対立遺伝子が形成されたと考えられる。一方、現存のBALB/cマウスの祖先に当たる個体群では、第5エクソンを発現するような遺伝子多型の獲得が起こり、ハツカネズミの祖先がユ

ーラシア大陸西部と北アフリカに分布していく過程で、このタンパク質低発現型対立遺伝子が広く分布するようになった。この事実は、レトロウイルスに対して強い複製制限能を示す APOBEC3 分子が大量に発現することは、宿主である哺乳動物のゲノム安定性にマイナスの影響を与える可能性があることを示唆する。

霊長類の比較ゲノム解析により、APOBEC3G 遺伝子は系統特異的な選択を受けたと推定された。また、ヒト APOBEC3G 遺伝子の H186R 多型は、日本人およびインド人で、HIV 感染/AIDS 発症との関連を認めなかった。APOBEC3G 遺伝子近傍の新たな連鎖不平衡ブロックを明らかにし、この領域内のメチル化に大きな個体差があることを見出した。

ベトナムにおける HIV 感染夫婦の特徴は、インデックスケースの多くに IDU が含まれることであり、配偶者の HIV 非感染とインデックスケースの IDU 歴との間に有意な相関が認められた。この集団における HIV 暴露非感染配偶者は、HIV 感染配偶者に比べ結婚歴が有意に長く、しかし HIV 診断までの夫婦間性的接触回数に差がなく、殆どコンドームを使用していないことから、なんらかの生物学的メカニズムによって HIV 感染に抵抗をもつ集団である可能性が高意図考えられた。従って、この手段が本研究目における遺伝的解析の象集団として適切であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 宮澤 正顯. 生理的に機能するレトロウイルス複製制限因子 APOBEC3 の分子進化. ウイルス 62:印刷中, 2012.
- 2) Li, J., Y. Hakata, E. Takeda, Q. Liu, Y. Iwatani, C. A. Kozak, and M. Miyazawa. Two genetic determinants acquired late in *Mus* evolution regulate the inclusion of exon 5, which alters mouse APOBEC3 translation efficiency. *PLoS Pathog.* 8: e1002478, 2012.
- 3) Tamashiro, T., Y. Tanabe, T. Ikura, N. Ito, N., and M. Oda. Critical roles of Asp270 and Trp273 in the α -repeat of the carbohydrate-binding module of endo-1,3- β -glucanase for laminarin-binding avidity. *Glycoconj. J.* 29: 77-85, 2012.
- 4) Nomura, W., A. Masuda, K. Ohba, A. Urabe, N. Ito, A. Ryo, N. Yamamoto, and H. Tamamura. Effects of DNA binding of zinc finger and linkers for domain fusion on catalytic activity of sequence-specific chimeric recombinases determined by a facile fluorescent system. *Biochemistry* 51:

1510-1517, 2012.

- 5) Saito, Y., T. K. Naruse, H. Akari, T. Matano, and A. Kimura. Diversity of MHC class I haplotypes in cynomolgus macaques. *Immunogenetics* 64: 131-141, 2012.
- 6) Takaki, A., A. Yamazaki, T. Maekawa, H. Shibata, K. Hirayama, A. Kimura, H. Hirai, and M. Yasunami. Positive selection of Toll-like receptor 2 polymorphisms in two closely related old world monkey species, rhesus and Japanese macaques. *Immunogenetics* 64: 15-29, 2012.
- 7) Ishii, H., M. Kawada, T. Tsukamoto, H. Yamamoto, S. Matsuoka, T. Shiino, A. Takeda, M. Inoue, A. Iida, H. Hara, T. Shu, M. Hasegawa, T. K. Naruse, A. Kimura, M. Takiguchi, and T. Matano. Impact of vaccination on cytotoxic T lymphocyte immunodominance and cooperation against simian immunodeficiency virus replication in rhesus macaques. *J. Virol.* 86: 738-745, 2012.
- 8) Miyazawa, M., S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwara, T. Chikaishi, and M. Kato. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. *Retrovirology* 8 (Suppl. 2):O30, 2011.
- 9) Sironi, M., F. R. Guerini, C. Agliardi, M. Biasin, R. Cagliani, M. Fumagalli, D. Caputo, A. Cassinotti, S. Ardizzone, M. Zanzottera, E. Bolognesi, S. Riva, Y. Kanari, M. Miyazawa, and M. Clerici. An evolutionary analysis of RAC2 identifies haplotypes associated with human autoimmune diseases. *Mol. Biol. Evol.* 28: 3319-3329, 2011.
- 10) Ogawa, T., S. Tsuji-Kawahara, T. Yuasa, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, H. Matsumura, T. Seya, T. Saga, and M. Miyazawa. Natural killer cells recognize Friend retrovirus-infected erythroid progenitor cells through NKG2D-RAE-1 interactions in vivo. *J. Virol.* 85: 5423-5435, 2011.
- 11) Hayasaka, N., K. Aoki, S. Kinoshita, S. Yamaguchi, J. K. Wakefield, S. Tsuji-Kawahara, K. Horikawa, H. Ikegami, S. Wakana, T. Murakami, R. Ramabhadran, M. Miyazawa, and S. Shibata. Attenuated food anticipatory activity and abnormal circadian locomotor rhythms in Rgs16 knockdown mice. *PLoS ONE* 6: e17655, 2011.
- 12) Nomura, W., N. Ohashi, Y. Okuda, T. Narumi, T. Ikura, N. Ito, H. and Tamamura. Fluorescence-quenching screening of protein kinase C ligands with an environmentally sensitive fluorophore *Bioconjugate Chem.* 22:

923-930, 2011.

13) Fujii, S., H. Masuno, Y. Taoda, A. Kano, A. Wongmayura, M. Nakabayashi, N. Ito, M. Shimizu, E. Kawachi, T. Hirano, Y. Endo, A. Tanatani, and H. Kagechika. Boron cluster-based development of potent non-secosteroidal vitamin D receptor ligands: Direct observation of hydrophobic interaction between protein surface and carborane. *J. Am. Chem. Soc.* **133**: 20933-20941, 2011.

14) Ohtani, H., T. Nakajima, H. Akari, T. Ishida, and A. Kimura. Molecular evolution of immunoglobulin superfamily genes in primates. *Immunogenetics* **63**: 417-428, 2011.

15) Chen, Z., T. Nakajima, Y. Inoue, T. Kudo, M. Jibiki, T. Iwai, and A. Kimura. A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of MyD88 gene is associated with Buerger disease but not with Takayasu arteritis in Japanese. *J. Hum. Genet.* **56**: 545-547, 2011.

16) Takahara, Y., S. Matsuoka, T. Kuwano, T. Tsukamoto, H. Yamamoto, H. Ishii, T. Nakasone, A. Takeda, M. Inoue, A. Iida, H. Hara, T. Shu, M. Hasegawa, H. Sakawaki, M. Horiike, T. Miura, T. Igarashi, T. K. Naruse, A. Kimura, and T. Matano T. Dominant induction of vaccine antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses after simian immunodeficiency virus challenge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **408**: 615-619, 2011.

17) Naruse, T. K., Y. Okuda, K. Mori, H. Akari, T. Matano, and A. Kimura. ULBP4/RAET1E is highly polymorphic in the Old World monkey. *Immunogenetics* **63**: 501-509, 2011.

18) Nakamura, M., Y. Takahara, H. Ishii, H. Sakawaki, M. Horiike, T. Miura, T. Igarashi, T. K. Naruse, A. Kimura, T. Matano, and S. Matsuoka. Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T lymphocyte responses during primary simian immunodeficiency virus infection in Burmese rhesus macaques. *Microbiol. Immunol.* **55**: 768-773, 2011.

19) Takahashi, M., Z. Chen, K. Watanabe, H. Kobayashi, T. Nakajima, A. Kimura, and Y. Izumi. Toll-like receptor 2 gene polymorphisms associated with aggressive periodontitis in Japanese. *Open Dent. J.* **5**: 190-194, 2011.

20) Mori, M., B. Sriwanthana, N. Wichukchinda, C. Boonthimat, N. Tsuchiya, T. Miura, P. Pathipvanich, K. Ariyoshi, and P. Sawanpanyalert. Unique CRF01_AE Gag

CTL Epitopes Associated with Lower HIV-Viral Load and Delayed Disease Progression in a Cohort of HIV-Infected Thais. *PLoS One* **6**: e22680, 2011

21) Rojanawiwat, A., N. Tsuchiya, P. Pathipvanich, W. Pumpradit, W. P. Schmidt, S. Honda, W. Auwanit, P. Sawanpanyalert, and K. Ariyoshi. Impact of the National Access to Antiretroviral Program on the incidence of opportunistic infections in Thailand. *International Health* **3**: 101-107, 2011

2. 学会発表

1) Miyazawa, M. Resistance to HIV infection and AIDS progression. **NEKKEN Research Conference: HIV Patients Care and Research in Southeast Asia.** March 22-23, 2012. Nagasaki, Japan.

2) Tsuchiya N., P. Pathipvanich, A. Rojanawiwat, W. Auwanit, K. Ariyoshi, P. Sawanpanyalert. HLA-B*3505 and female gender were strong predictive factors of modifying the first antiretroviral drug regimen due to adverse effect in Thailand. **CROI.** March 5-8, 2012, Seattle, USA.

3) Pathipvanich, P., N. Tsuchiya, A. Rojanawiwat, W. Auwanit, P. Sawanpanyalert, K. Ariyoshi. Impact of the national antiretroviral program on mortality and the duration of access to treatment among HIV-infected patients in northern Thailand. **CROI.** March 5-8, 2012, Seattle, USA.

4) Mori, M, N. Wichukchinda, R. Miyahara, M. Yasunami, K. Ariyoshi. Viral adaptation against KIR2D-associated Gag immune pressure & their effect on clinical outcome among HIV-1 CRF01_AE-infected Thais. **CROI.** March 5-8, 2012, Seattle, USA.

5) 有吉 紅也. HIV治療の進歩からエイズ流行制圧へ. 第296回日本内科学会九州地方会 生涯教育講演会. 2012年1月, 福岡.

6) Miyazawa, M., S. Takamura, S. Tsuji-Kawahara, E. Kajiwarra, T. Chikaishi, and M. Kato. A hole in the T-cell repertoire induced after retroviral infection of immunocompetent adult mice. **Frontiers of Retrovirology** **2011.** Oct. 3-5, 2011, Amsterdam, The Netherlands.

7) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, S. Kinoshita, T. Chikaishi, H. Matsukuma and H. Kawabata. Host immune responses determine integration of either F-MuLV alone or F-MuLV plus SFFV in Friend virus leukemogenesis. **The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis.** Nov. 2-5, 2011, Montpellier, France.

- 8) Miyazawa, M., S. Tsuji-Kawahara, Y. Hakata, J. Li, E. Takeda, and C. Ishihara. Functional consequences of mouse APOBEC3 gene polymorphisms and multiple genetic factors that influence the production of virus-neutralizing antibodies in Friend virus-infected mice. **The 23rd Workshop on Retroviral Pathogenesis**. Nov. 2-5, 2011, Montpellier, France.
- 9) Kato, M., S. Tsuji-Kawahara, S. Kinoshita, T. Chikaishi, S. Takamura, and M. Miyazawa. Production of virus-neutralizing antibodies and protection against lethal retroviral infection in AID-deficient mice. **第40回日本免疫学会学術集会**. 2011年11月27~29日, 千葉.
- 10) Takamura, S., E. Kajiura, S. Tsuji-Kawahara, T. Chikaishi, M. Kato, S. Kinoshita, M. Itoi, N. Sakaguchi, and M. Miyazawa. Infection of thymus with murine retrovirus induces virus-specific central tolerance that prevents dynamic differentiation of functional memory CD8⁺ T cells. **第40回日本免疫学会学術集会**. 2011年11月27~29日, 千葉.
- 11) 大橋 南美, 野村 渉, 鳴海 哲夫, 奥田 善章, 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡, Nancy E. Lewin, 糸谷 恭子, Peter M. Blumberg, 玉村 啓和. 環境応答性蛍光基を活用したPKCリガンドのorthogonal screening methods. **第6回日本ケミカルバイオロジー学会年会**. 2011年5月23~25日, 東京.
- 12) 肥後 邦武, 砂橋 朗進, 森井 尚之, 池上 貴久, 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡, 安部 良, 織田 昌幸. CD28 細胞内領域とアダプター分子 Gads SH2 及び Grb2 SH2 との分子間相互作用解析. **第11回日本蛋白質科学会年会**. 2011年6月7~9日, 大阪.
- 13) 伊倉 貞吉, 伊藤 暢聡. 表面プラズモン共鳴法によるタウタンパク質と Pin1 との相互作用解析. **第11回日本蛋白質科学会年会**. 2011年6月7~9日, 大阪.
- 14) Ikura, T. and N. Ito. Dissection analysis of interactions between tau protein and Pin1. **第49回日本生物物理学会年会**. 2011年9月16~18日, 大阪.
- 15) Ito, N. Protein Data Bank Japan (PDBj). (招待講演) **OIST/CCP4 School 2011**. December 5-9, 2011, Okinawa.
- 16) Izumi, T., K. Io, M. Yokoyama, M. Shinohara, K. Shirakawa, M. Matsui, H. Kondoh, T. Uchiyama, H. Sato, K. Shindo, and A. Takaori-Kondo. Arginine at position 122 of APOBEC3G might be involved in interaction to Vif, but not to RNA required for encapsidation. **International Congress of Virology 2011**. September 11-16, 2011, Sapporo, Japan.
- 17) 中島 敏晶, 大谷 仁志, 明里 宏文, 石田 貴文, 木村 彰方. 霊長類における免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)の分子進化. **第20回日本組織適合性学会大会**. 2011年8月15-17日, 静岡.
- 18) 成瀬 妙子, 奥田 裕紀子, 森 一泰, 明里 宏文, 俣野 哲朗, 木村 彰方. 旧世界ザルにおける ULBP4/RAET1E 遺伝子の多様性. **第20回日本組織適合性学会大会**. 2011年8月15-17日, 静岡.
- 19) Ishii H., N. Iwamoto, S. Matsuoka, M. Inoue, A. Iida, H. Hara, T. Shu, M. Hasegawa, T. Naruse, A. Kimura, and T. Matano. Efficacy of single epitope-specific cytotoxic T lymphocyte induction by vaccination against a simian immunodeficiency virus challenge. **International Congress of Virology**. September 11-16, 2011, Sapporo, Japan.
- 20) Takahara, Y., M. Nakamura, R. Higashi, M. Horiike, T. Miura, T. Igarashi, T. Naruse, A. Kimura, T. Matano, and S. Matsuoka. Cytotoxic T lymphocyte responses during highly active antiretroviral therapy in simian immunodeficiency virus-infected macaques. **International Congress of Virology**. September 11-16, 2011, Sapporo, Japan.
- 21) Takahara, Y., M. Nakamura, H. Sakawaki, T. Miura, Y. Koyanagi, T. Naruse, A. Kimura, T. Matano, and S. Matsuoka. Impact of therapeutic vaccination during HAART on CTL immunodominance in SIV infection. **The 12th Kumamoto AIDS seminar**. October 19-21, 2011, Kumamoto, Japan.
- 22) 成瀬 妙子, 森 一泰, 明里 宏文, 俣野 哲朗, 木村 彰方. アカゲザル ULBP2/RAET1H 遺伝子の多様性. **日本人類遺伝学会第56回大会**. 2011年11月24-27日, 千葉.
- 23) 中村 碧, 高原 悠佑, 阪脇 廣, 堀池 麻里子, 三浦 智行, 五十嵐 樹彦, 成瀬 妙子, 木村 彰方, 俣野 哲朗, 松岡 佐織. サルエイズモデル感染初期における MHC クラス I ハプロタイプ別の CTL 反応優位パターンの解析. **第25回日本エイズ学会学術集会**. 2011年11月30日~12月2日, 東京.
- 24) Tsuchiya, N., P. Pathipvanich, A. Rojanawiwat, K. Ariyoshi, P. Sawanpanyalert. Frequency and Determinants of Modifying the First Antiretroviral Drug Regimen in Northern

Thailand. **The 10th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific.** August 26-30, 2011. Busan, Republic of Korea.

25) Pathipvanich, P., N. Tsuchiya, A. Rojanawiwat, P. Sawanpanyalert, K. Ariyoshi. Fifteen years of experience in treating HIV-infected patients at a single HIV center of a government hospital in northern Thailand. **The 10th International Congress on AIDS in Asia and the Pacific.** August 26-30, 2011. Busan, Republic of Korea..

26) 土屋 菜歩、P. Pathivanich、A. Rojanawiwat, P. Sanwayanwalert、有吉 紅也。北タイ政府系病院 HIV 外来における。15 年間の死亡率の変化と患者数の推移。日本熱帯医学会・日本国際保健医療学会合同大会。2011 年 11 月 4 日～6 日、東京。

27) 土屋 菜歩、P. Pathivanich、N. Wichukchinda, P. Sanwayanwalert、有吉 紅也。北タイ政府系病院 HIV 外来における多剤併用療法の薬剤変更率とその原因について。日本エイズ学会学術集会・総会。2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日、東京。

28) 土屋 菜歩、K. Ruchsawat, P. Pathipvanich、田中 靖人、P. Sanwayanwalert、有吉 紅也。北タイ政府系病院 HIV 外来通院 B 型肝炎重複感染者におけるラミブジン耐性ウイルスの出現状況について。日本エイズ学会学術集会・総会。2011 年 11 月 30 日～12 月 2 日、東京。

H. 知的所有権の出願・取得状況
該当するもの無し

Ⅱ. 分担研究報告書

マウス APOBEC3 機能性多型の分子基盤解析

研究分担者 宮澤 正顯（近畿大学医学部 教授）

研究要旨 APOBEC3 は一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼであり、細胞内でレトロウイルス複製制限因子として機能する。既存の感染性レトロウイルスは自然宿主の APOBEC3 に対抗する機能を獲得しており、APOBEC3 は異種由来レトロウイルスに対してしか効果が無いと信じられていた。我々はマウスの APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対して強い複製制限効果を示しうることを、マウス *APOBEC3* 遺伝子には多型があり、感染抵抗性の系統で発現する対立遺伝子は転写レベルで高発現であって、第 5 エキソンを含まないことを見出していた。今年度は、抵抗性対立遺伝子の産物はタンパク質レベルでも高発現であること、その理由は第 5 エキソンを欠く転写産物がこのエキソンを含む転写産物に比べて高い翻訳効率を示すためであること、抵抗性対立遺伝子の転写産物に第 5 エキソンが含まれない理由は、第 4 イントロンの RNA 分岐部位と、第 5 エキソン内部の機能的な塩基配列多型にあることを解明し、その進化論的意義を考察した。

A. 研究目的

これまで実用化されて来た抗レトロウイルス薬は、ウイルス遺伝子産物そのものを標的とし、逆転写やプロウイルス組込み、或いは粒子成熟過程を阻害する。一方、強力な生物学的変異原であるレトロウイルスの染色体組込みを阻止するため、哺乳類は複数の細胞内複製制限因子を獲得して来た。一本鎖 DNA を標的とするシチジンデアミナーゼ APOBEC3 はその一つである。哺乳類による APOBEC3 獲得後に霊長類に感染するようになったレンチウイルス群は、Vif タンパク質により APOBEC3 の細胞内分解を促進することで、標的細胞での複製阻害を回避している。しかし、自然宿主でないマウスの APOBEC3 は、Vif の有無に関わらず HIV-1 複製を強く阻害出来る。

我々はマウス APOBEC3 が同種由来レトロウイルスに対する生理的複製制限因子であり、自然抵抗性の異なる系統間に機能的遺伝子多型があることを、米国の Warner Greene らと同時に、世界で初めて報告した。抵抗性対立遺伝子は転写レベルで発現量が高く、その産物が第 5 エキソンを欠損するのに対し、感受性対立遺伝子は低発現で、その産物は全長型主体であること、両対立遺伝子産物は互いにアミノ酸配列が異なり、N-末端側が複製抑制活性を決定すること、抵抗性遺伝子産物によるレトロウイルス複製抑制はデアミナーゼ活性非依存的であることは、我々が Greene らに先駆けて正確に示した。

マウス APOBEC3 とヒト APOBEC3G の N-末端

側 Z2 ドメインは、系統発生的にもデアミナーゼ活性部位のアミノ酸配列からも相同であるから、我々の見出した Z2 ドメインの機能的アミノ酸配列多型と第 5 エキシソンの作用機構を明らかにすることで、ヒト APOBEC3G に Vif による阻害を受けない HIV-1 複製抑制能を付与する分子設計の基盤が築けると考えられる。しかし、過去に X 線結晶構造解析が行われているのはヒト APOBEC3G の C-末端側 Z3 ドメインのみであり、N-末端側ドメインの詳細な構造とその機能との相関は、ヒトでもマウスでも明らかでない。

本研究では、マウス *APOBEC3* 遺伝子座における機能的多型の存在を基礎に、APOBEC3 タンパク質の構造安定性と機能に対する第 5 エキシソンの役割を明らかにし、最終的に Z2 ドメインの立体構造とデアミナーゼ非依存的なレトロウイルス複製抑制機構関係を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) マウス *APOBEC3* 各対立遺伝子産物タンパク質の高発現系構築

研究分担者である伊藤による X 線結晶構造解析に資する目的と、試験管内でのタンパク質間相互作用解析に用いる目的で、高機能型の C57BL/6 (B6) マウス由来、及び低機能型の BALB/c マウス由来 APOBEC3 cDNA を、伊藤より提供された大腸菌発現ベクターに組込み、末端に挿入した精製用タグに対する抗体を用いて、Western blot 法でタンパク質発現を解析した。