

2) 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 或いは未感染健全人との間で、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 C57BL/6 (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。

3) 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、これまで明かできなかった。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には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。

4) 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3)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。

【倫理面への配慮】

本研究計画にはヒト検体を用いた解析を含まないが、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近畿大学遺伝子組換え実験安全管理員委員会による、それぞれ承認を得て、必要な疼痛防止或いは拡散防止措置の下で実施した。

C. 研究結果

1) マウス APOBEC3 各対立遺伝子産物の発現系の構築

分担研究者の伊藤より提供された大腸菌発現ベクター pET28a に、B6 及び BALB/c マウス由来 APOBEC3 cDNA の種々のエキソン構成断片を組み込み、C-末端側に酵素切断可能なポリヒスチジンタグを挿入して、組換えプラスミドを構築した。このうち、N-末端側のごく少数のアミノ酸残基をコードする第1エキソンを除いた組換えプラスミドでトランスフォームした大腸菌から、大量のマウス APOBEC3 タンパク質発現を検出することが出来、以後のタンパク質精製と解析のため、伊藤に提供した。

2) 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1)。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

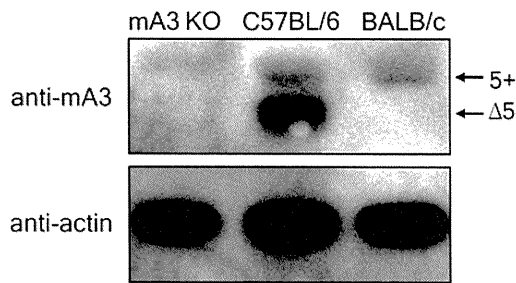


図1. 脾細胞における内因性マウス APOBEC3 (mA3) タンパク質の発現 APOBEC3 ノックアウトマウス(mA3KO)を陰性対照として用いた。

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エクソン欠損型の 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エク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、ルン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、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 Δ5 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。

3) 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エクソンを欠損する Δ5 トランスクリプトを高発現するが、感受性系統は第5エクソンを含む全長型 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エクソンから第5エク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エクソン 3'-末端のドナー配列には多型が無いこと、一方第5エクソン上流については、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

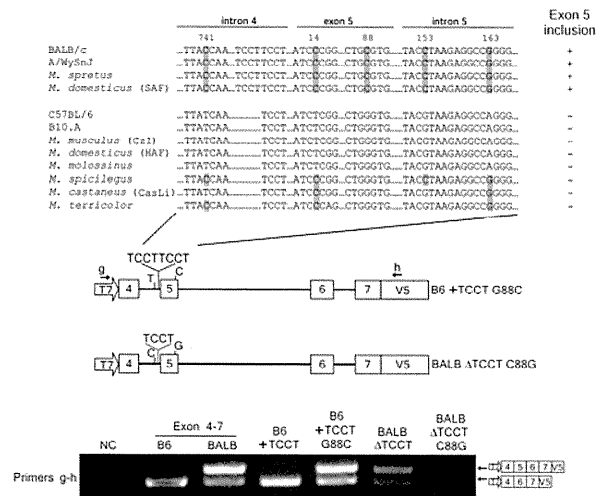


図2. マウス APOBEC3 第5エクソン周辺のゲノム塩基配列多型と mRNA への第5エクソン取り込み 上段は実験室系のマウスと複数種の野生マウスにおける第5エクソン周辺のゲノム塩基配列と、cDNA 解析による第5エクソン発現の有無をまとめたもの。野生種マウスの種名の後にある括弧内の名称は、それぞれの捕獲地を反映する。下段はゲノム DNA クローンをを用いた試験管内でのスプライシング実験の結果。

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エク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エク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エク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エクソンから第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エクソンを含む第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 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、

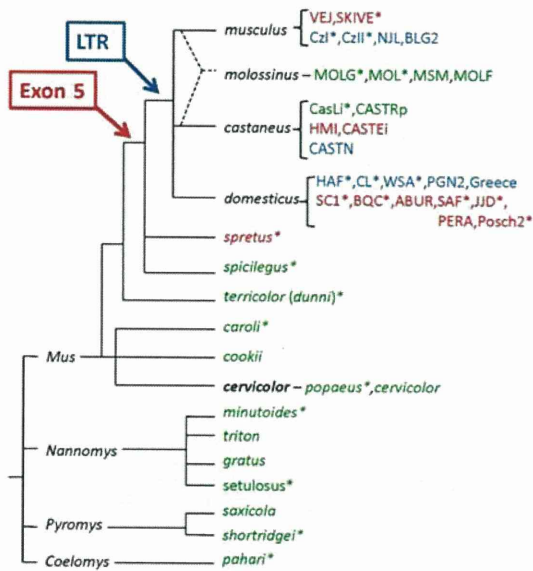


図3. 齧歯類における *APOBEC3* 遺伝子多型の進化系統樹 緑で示す種は、*APOBEC3* 遺伝子転写産物が第5エクソンを含まず、第2イントロンへの内在性レトロウイルスLTRの組込みもない、祖先型の遺伝子型を有する。赤の矢印で示す時点で、一部の個体群に第5エクソンを発現する現存のBALB/c型の遺伝子多型獲得が起こり、*M. musculus*, *M. castaneus* と *M. domesticus* の一部、及び *M. spretus* (赤文字) がそれを受け継いでいる。その後、別の個体群が第2イントロンへのLTR組込み(青)を受け継ぐようになった。

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2)。

4) 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2)。

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

キソン内の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* 遺伝子型を持っていたこと、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エク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

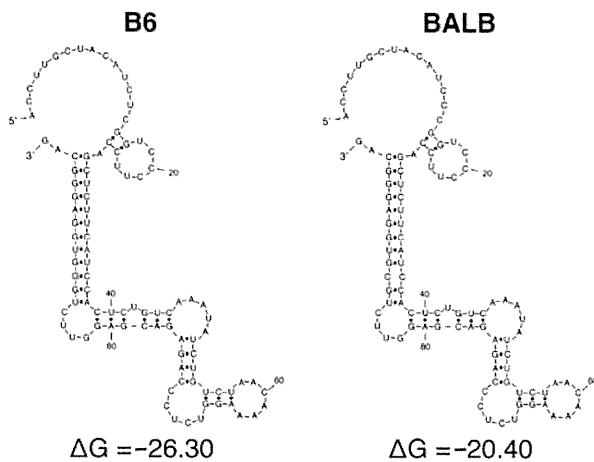


図4. *APOBEC3* 遺伝子転写産物第5エクソン部分の予測される二次構造 B6型対立遺伝子の転写産物は、第5エクソン部分が BALB/c 型対立遺伝子産物のそれよりも安定したステムループ構造を作るため、もしも mRNA に含まれれば翻訳の妨げになる可能性がある。また、GGG 配列の反復が多い分、スプライシングも起こりやすいと予想される。

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。

D. 考察

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(図1)。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、

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 エク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 エク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 エクソンコード部分の 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(図4)。

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 エク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エクソン内部に第 5 エクソンの 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(図2)、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 エク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 エク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 エク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 エク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。

E. 結論

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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 宮澤 正顕. 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) 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.
- 4) 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.

5) 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.

6) 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.

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) 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. **Frontiers of Retrovirology 2011.** Oct. 3-5, 2011, Amsterdam, The Netherlands.

3) 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.

4) 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.

5) 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.

6) Takamura, S., E. Kajiwara, 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.

- I. 知的所有権の出願・取得状況
該当するもの無し

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 京都大学大学院医学研究科 血液腫瘍内科 教授

研究要旨 APOBEC3G は潜在的に抗 HIV-1 作用を示すが、ウイルス Vif 蛋白がこれを分解促進することにより、ヒト細胞内でのウイルス複製を可能にしている。Vif と相互作用する APOBEC3G の領域として Z2ドメインにある DPD128-130 モチーフが知られているが、他の領域とも Vif が相互作用する可能性が示唆されている。我々は APOBEC3GZ2ドメイン構造モデルをガイド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。この部位は APOBEC3G がウイルス粒子に取り込まれるのに必要な部位ではないため、AIDS/HIV-1 に対する治療の新たな標的となる可能性がある。

A. 研究目的

APOBEC3Gは一本鎖DNAに対するシトシン脱アミノ化酵素であり、潜在的に抗HIV-1作用を示すが、ウイルスVif蛋白がこれを分解促進することにより、ヒト細胞内でのHIV-1複製を可能にしている。Vifと相互作用をするAPOBEC3Gの領域はAIDS/HIV-1に対する治療の新たな標的と考えられるが、すでに報告されているDPD128-130モチーフ以外にも新たな結合モチーフが存在することが示唆されている。本研究ではVifと相互作用をするAPOBEC3Gの領域を明らかにすることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

APOBEC2の結晶構造を用いてAPOBEC3GZ2ドメインの構造モデルを作成し、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。

- 1) Vifとの共沈実験によりVifとの結合能を評価した。
- 2) Vifと共発現させたときに発現が低下するかをイムノブロット法により評価した。
- 3) 免疫沈降物の定量的PCRによりRNA結合能を評価した。
- 4) 精製ウイルスに対するイムノブロット法によりウイルスの取り込みを評価した。

【倫理面への配慮】

本研究では実験動物やヒトの検体を用いておらず、特に倫理面の配慮はしていない。

C. 研究結果

R122AおよびR122E変異体は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。

D. 考察

R122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はHIV-1/AIDSの新しい治療薬となる可能性がある。

E. 結論

Vif/APOBEC3Gの相互作用表面にあるアミノ酸を新たに一つ同定した。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Izumi, T., Io, K., Yokoyama, M., Shinohara, M., Shirakawa, K., Matsui, M., Kondoh, H., Uchiyama, T., Sato, H., Shindo, K. and Takaori-Kondo, A. 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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（東京医科歯科大学大学院疾患生命科学部 教授）

研究要旨 マウスのレトロウイルスに対する生理的抵抗因子である APOBEC3 分子には、多型が存在し、レトロウイルス抵抗性に差異を生じている。しかしながら、この多型がタンパク質の立体構造に与える影響や多型と抵抗性との相関の分子構造基盤は、明らかになっていない。

これらの点を解明するために、X線結晶解析によるマウス APOBEC3 分子の構造解析をめざし、ウイルスの複製抑制活性に関与している N-末端側ドメインの立体構造解析を目的に、このドメインの大量発現系の構築と精製方法の確立をめざした。その結果、構造解析に十分な量の試料を高純度かつ高濃度で得ることができ、結晶化条件の探索を開始した。

A. 研究目的

マウスはレトロウイルスに対する生理的抵抗因子として APOBEC3 (mA3) を持っているが、その遺伝子には多型が存在し、ウイルスに対する自然抵抗性と密接に関連している。

mA3 は N 末端側の Z2 ドメインと C 末端側の Z3 ドメインからなるが、このうち N 末端側 Z2 ドメイン (mA3-N) がウイルス抵抗性に関与していることが明らかになっている。このドメインはヒトの APOBEC3G の N 末端側 Z2 ドメインと相同であるため、mA3-N のウイルス抑制機能に関する知見は、ヒト APOBEC3G と HIV-1 の関係を理解する上でも重要な知見を与えうると考えられる。

本研究では、mA3-N の多型とウイルス抑制機能の分子基盤をタンパク質の立体構造の面から明らかにすることを目的に、mA3-N の立体構造を X 線結晶解析で決定することをめざす。その端緒として、構造解析に必要なとされる量と質を持つタンパク質試料を得るために、mA3-N のバクテリアによる発現系の構築と精製方法の確立を本年度の目的とした。

B. 研究方法

1) mAPOBEC3 の大量発現

抵抗性型 B6 マウスと感受性型 BALB/c マウスの両系統について、mA3-N の cDNA を 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、それぞれ設計・構築した。発現後の精製のためにタンパク質の N 末端にヒスチジンタグ (His-tag) とトロンピ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。

mA3-N 発現の確認は SDS-PAGE で行った。

2) mAPOBEC3 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。

一般的に His-tag は結晶化には不利に働くと考えられるので、上述の精製後、トロンピ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 mA3-N 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。

【倫理面への配慮】

本研究はマウス由来のタンパク質をバクテリアで発現させるものであるため、倫理面の問題は無いと判断した。

C. 研究結果

1) mAPOBEC3 N 末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 mA3-N タンパク質の発現が SDS-PAGE によって確認された。ただし、発現誘導後も 37°C で培養した場合で

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、発現誘導後の温度を低温にすることで可溶性での発現を得た。

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には十分なものであった。

また、抵抗性型ドメインの方が感受性型ドメインよりもやや発現量が多かった。

2) mAPOBEC3 N末端ドメインの精製

発現された mA3-N 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 mA3-N 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。しかしながら、カラムからの溶出後、比較的短時間で沈澱してしまっただ。そこで様々な溶媒条件を試した結果、ある程度安定な条件を見つけ、イオン交換クロマトグラフィーに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)。

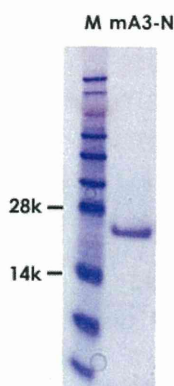


図1. 精製後のマウス APOBEC3 アミノ末端ドメインの SDS-PAGE (M: 分子量マーカー)

こうした精製終了後に、精製用の His-tag の除去のためにトロンピンによる酵素切断処理を試みたが、切断効率がかなり低く、過剰量のトロンピンを用いてもなお、十分な切断が得られなかったため、His-tag が残ったままの状態での後の実験を行うこととした。

なお、上述のニッケル樹脂アフィニティー、イオン交換、ゲル濾過のいずれのクロマトグラフィーにおいても、抵抗性型の mA3-N と感受性型の mA3-N の間で、溶出点などの特性に大きな違いはなかった。

クロマトグラフィーにより精製された試料は、限

外濾過による濃縮により、5mg/ml 以上の濃度に濃縮することができ、高純度・高濃度の mA3-N の試料を得ることができた。

動的光散乱実験による粒子径の測定では、精製された mA3-N 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 (mono-disperse) 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 強であることが判った。

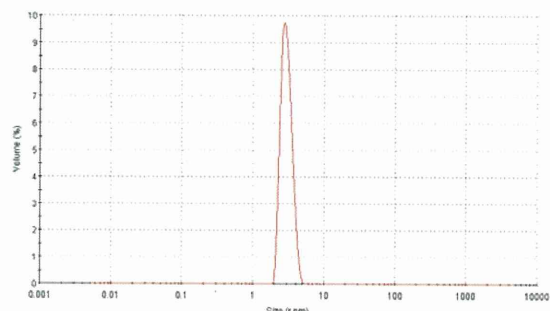


図2. 動的光散乱法によるマウス APOBEC3 アミノ末端ドメイン試料の粒子径分布の測定結果

D. 考察

本研究では、マウスの APOBEC3 の多型と HIV-1 に対する感受性との関係を分子構造の点から調べるために、立体構造解析を目的としたタンパク質試料の大量発現と精製法の確立をめざした。

mA3-N は大腸菌内で可溶性形で発現された。発現量は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。

ウイルス抵抗性型の mA3-N の方が感受性型のものより発現量が多い傾向が見られたが、これが細胞内での安定性など、生化学的な意味を持つのかは現段階では不明である。

発現された mA3-N は発現した大腸菌内では可溶性であるのに、細胞破碎後は可溶性に問題がみられた。これは、タンパク質をその全長ではなくドメイン単位で発現させた場合によく見られる現象であるが、一方でイオン交換カラムによる精製後は可溶性に改善が見られたことから、mA3-N が大腸菌細胞由来の夾雑物と非特異的に相互作用して沈澱している可能性も考えられる。

最終的な精製産物は、SDS-PAGE 上でほぼ single band であり(図1)、高純度の試料が得られたと思われる。

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(図2)。

一方、同実験で得られた粒子径から見積もられた mA3-N 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、mA3-N 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 ZD ドメインからなる mA3 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。

一般に、構造解析用の試料をバクテリアで発現させる場合、精製用のタグを付加することが多いが、付加されたタグ自体は結晶化にネガティブに働くことが多い。そこで、特異性の高いプロテアーゼでタグを除去することがよく行われ、本研究でもトロンビンによる特異的切断が試された。効率的な切断が得られなかったため、その後の実験を、His-tag 存在下で行ったが、十分な回折能をもつ結晶を得る確率を上げるため、今後、トロンビンの反応条件、あるいは異なるプロテアーゼの利用など精製タグの除去方法の検討が必要であると思われる。

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。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精製をすることができた。

得られた mA3-N 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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura, W., Ohashi, N., Okuda, Y., Narumi, T., Ikura, T., Ito, N., and Tamamura, H. Fluorescence-quenching screening of protein kinase C ligands with an environmentally sensitive fluorophore *Bioconjugate Chem.* **22**: 923-930, 2011.
- 2) Fujii, S., Masuno, H., Taoda, Y., Kano, A., Wongmayura, A., Nakabayashi, M., Ito, N., Shimizu, M., Kawachi, E., Hirano, T., Endo, Y., Tanatani, A., and Kagechika, H. 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.

3) Tamashiro, T., Tanabe, Y., Ikura, T., Ito, N., and Oda, M. 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., Masuda, A., Ohba, K., Urabe, A., Ito, N., Ryo, A., Yamamoto, N., and Tamamura, H. 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.

2. 学会発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) Ikura, T. and Ito, N. 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.
- 5) Ito, N. Protein Data Bank Japan (PDBj). (招待講演) OIST/CCP4 School 2011. December 5-9, 2011, Okinawa.

J. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し

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（長崎大学熱帯医学研究所 教授）

研究要旨 本年度は、アジア人における HIV-1 感染抵抗性と相関するヒトの APOBEC3 群遺伝子多型の有無を明らかにする目標に向け第 2 のアジア人対象集団を開発するために、北ベトナムバクマイ病院 HIV 外来に通院する HIV 感染者を対象に後ろ向き調査研究を行った。その結果 387 名から情報が得られ、男性既婚 HIV 感染者の配偶者の 63%は HIV 非感染者であること、非感染配偶者をもつ感染者は、感染配偶者をもつ感染者に比べ結婚歴が有意に長く、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が判明した。以上のことから、同病院に通院する HIV 非感染配偶者は、HIV 感染に抵抗性を有する集団であり、本研究の対象集団として適切であると考えられた。

A. 研究目的

哺乳類は、その進化の過程で、多くのレトロウイルスによるゲノムへのプロウイルス組み込みを細胞レベルで阻止するために、複数の細胞内レトロウイルス複製阻害因子を獲得してきた。その一つが逆転写過程で形成される一本鎖 DNA を標的にそのシトシン塩基をウラシルへと変換するシチジンデアミナーゼ APOBEC3 酵素群である。一方で、HIV は、APOBEC3 群酵素を分解する Vif タンパク質を獲得したことにより、宿主の APOBEC3 機能を回避することが可能になり、約 100 年前よりヒト集団に侵入し、過去 30 年間、ヒト集団のなかで流行を拡大してきた。

本代表研究者の宮澤らは、イタリア人ヒトコホート集団において、APOBEC3G 機能多型を調べることにより、CD14 単球におけるタンパク質レベルでの APOBEC3 群酵素発現量と HIV-1 曝露非感染者との相関を報告してきた (Biasin, M., et al. J. Infect. Dis. 195:960, 2007)。しかし、これまで、ヒト APOBEC3 遺伝子群の多型と HIV-1 感染抵抗性或いはエイズ進行との関連については、決定的なデータは得られていない。また、アジアにおける集団において、これら APOBEC3 群の機能多型・遺伝子多型に関する研究は、未だない。

そこで、本分担研究の最終目標は、アジア人において、APOBEC3 群酵素発現量、さらには発現量を決定づける遺伝子型と HIV-1 曝露非感染者との相関およびエイズ進行遅延との相関を明らかにすることにある。そのためのひとつのアプローチとして、まずは、本研究分担者の有吉らが運営するタイ人 HIV 感染者およびその配偶者コホート集団において APOBEC3 分子の機能多型を調べ、HIV-1 病態 (HIV-1 感染抵抗性やエイズ進行遅延) との相関の有無を判明させることを研究

目的のひとつとする。さらに、これらと相関する APOBEC3 群遺伝子多型を明らかにし、これら遺伝子多型と HIV-1 感染抵抗性やエイズ進行遅延との相関を複数のアジア人コホート集団において明らかにすることをもうひとつの研究目的とする。

本研究分担者の有吉は、2000 年 7 月よりタイ国立衛生疫学研究所と共同で、北タイランバン総合病院を受診した HIV-1 感染者とその配偶者を対象にしたコホート研究を立ち上げ運営してきた。本研究の目的 1) は、これまで本コホート参加者から収集され凍結保存されてきた末梢血リンパ細胞検体を用いて実施される。平成 23 年度は、その前実験として、臨床検体を用いた APOBEC3 発現量と mRNA スプライシングパターンを評価する実験系の確立を試みると同時に、平成 24 年度に予定している実際の検体を用いた実験に向けて、現地研究協力者との研究調整を行った。また、平成 23 年度中に、本研究の目的 2) である APOBEC3G 機能性多型と相関する APOBEC3 群遺伝子多型と HIV-1 感染抵抗性やエイズ進行遅延との相関を、タイ人以外のアジア人コホート集団で解析するために、過去 10 年間に HIV 流行が拡大したベトナムにおいて HIV 感染者夫婦における夫婦間 HIV 伝播の現状を明らかにすることとした。

B. 研究方法

1) 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が 2,078 床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。本研究では、HIV 外来の開設以来、2009年10月26日より2010年12月31日までの14カ月間の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、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)を調査票を用いて後ろ向きに収集した。

2) 統計解析手法

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】

患者情報を保護するために、本研究では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とる。将来の研究に備え、連結可能とするが、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。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る。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する。本分担研究の実施については、長崎大学熱帯医学研究倫理委員会より許可を得ている。(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) 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、表1に示すとおりである。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。

2) 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を表2にまとめた。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/ μ l以上の群に比べて、CD4細胞数が50-200, 50/ μ l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; $p < 0.001$)。

3) 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、表3に比較した。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($p = 0.006$)。

表1. バクマイ病院 HIV 外来に通院する HIV 感染者の臨床疫学情報

		Total (n=387)	Male (n=247, 63.8%)	Female (n=140, 36.0%)	p value
Age	<30	181 (46.8)	94 (38.1)	87 (62.1)	<0.001
	31-40	170 (43.9)	127 (51.4)	43 (30.7)	
	41<	36 (9.3)	26 (10.6)	10 (7.2)	
	medan[iqr]	31 [28-35]	31 [28-35]	29 [25-34]	
Occupation	Employee	257 (66.4)	169 (68.4)	88 (62.9)	0.265
	Unemployed	130 (33.6)	78 (31.5)	52 (37.1)	
Ethnicity	Kinh	373 (96.4)	241 (97.6)	132 (94.3)	0.449
	Tay	7 (1.8)	3 (1.2)	4 (2.9)	
	Others	7 (1.8)	3 (1.2)	4 (2.9)	
Marriage status	Single	58 (15)	50 (20.2)	8 (5.7)	<0.001
	Separation (1)	51 (13.2)	8 (3.2)	43 (30.7)	
	Marriage (2)	277 (71.6)	188 (76.1)	89 (63.5)	
	Others	1 (0.3)	1 (0.4)	0 (0)	
Transmission route	Heterosexual	230 (59.4)	97 (39.3)	133 (95)	<0.001
	Homosexual	3 (0.8)	3 (1.2)	0 (0)	
	IDUs	138 (35.7)	137 (55.5)	1 (0.7)	
	Unknown	16 (4.1)	10 (4)	6 (4.3)	
HIV status of (ex)partner	Positive	170 (43.9)	66 (26.7)	104 (74.3)	<0.001
	Negative	130 (33.6)	113 (45.8)	17 (12.1)	
	Unknown	87 (22.5)	68 (27.5)	19 (13.6)	
CD4 count (/μl)	<50	120 (31.2)	87 (35.2)	33 (23.9)	<0.001
	51-200	125 (32.5)	92 (37.3)	33 (23.9)	
	201-500	92 (23.9)	49 (19.8)	43 (31.2)	
	501<	48 (12.5)	19 (7.7)	29 (21)	
	medan[iqr]	111 [40-334]	90.0 [37-216]	226.5 [56-473]	
Viral load (3) (log10RNAcopies/ml)	<2.00	15 (20.8)	10 (20)	5 (23.8)	0.791
	2.01-3.00	2 (2.8)	2 (4)	0 (0)	
	3.01-4.00	16 (22.5)	13 (26)	3 (4.2)	
	4.01-5.00	15 (20.8)	7 (14)	8 (11.3)	
	5.01-6.00	19 (26.8)	17 (34)	2 (2.8)	
	6.01<	4 (9.8)	1 (2)	3 (4.2)	
	Medan[iqr]	4.14 [3.06-5.29]	3.94 [3.06-5.29]	4.57 [3.20-4.80]	
Hb (g/L)	<80	27 (7)	20 (8.1)	7 (5)	<0.001
	81-120	151 (39.1)	82 (33.2)	69 (49.6)	
	121<	208 (53.9)	145 (58.7)	63 (45.3)	
	medan[iqr]	123 [105-137]	127 [106-142]	118 [103-129]	
Clinical Stage	1	145 (37.5)	68 (27.5)	77 (55)	<0.001
	2	32 (8.3)	23 (9.3)	9 (6.4)	
	3	59 (15.3)	50 (20.2)	9 (6.4)	
	4	150 (38.9)	106 (42.9)	44 (31.4)	
History of ART	naïve	324 (83.7)	40 (16.2)	21 (15)	0.732
	Not naïve	61 (15.8)	205 (83)	119 (85)	
HBV	Positive	55 (15.3)	42 (18.2)	13 (10.1)	0.108
	Negative	305 (84.7)	189 (81.8)	116 (89.9)	
HCV	Positive	160 (44.4)	142 (61.5)	18 (14)	<0.001
	Negative	200 (55.6)	89 (38.5)	111 (86.1)	
BMI	<16	28 (7.2)	19 (7.9)	8 (5.8)	0.619
	16.1-18.0	78 (20.2)	48 (20)	30 (21.9)	
	18.1-20.0	141 (36.4)	86 (35.8)	55 (40.2)	
	20.1<	140 (36.2)	87 (36.2)	44 (32.1)	
	medan[iqr]	19.1 [17.9-20.9]	19.3 [17.9-21.1]	19.1 [13.9-20.8]	

表2. 抗 HIV 薬治療未治療患者 324 名における日和見感染症罹患パターン

	n	%	95% CI
Tuberculosis	79	(24.4)	[19.7-29.1]
Pulmonary TB	43	(13.3)	[9.6-17]
Extra-pulmonary TB	36	(11.1)	[7.7-14.5]
TB lymphadenitis	20	(6.2)	[3.6-8.8]
TM meningitis	5	(1.5)	[0.2-2.8]
Pleural TB	3	(0.9)	[0-1.9]
Miliary TB	2	(0.6)	[0-1.4]
TBperitonitis	1	(0.3)	[0-0.9]
Other extra-pulmo TB	5	(1.6)	[0.2-3]
Zoster	37	(11.4)	[7.9-14.9]
Oral candida	35	(10.8)	[7.4-14.2]
Paniculosis	33	(10.2)	[6.9-13.5]
Esophageal candida	16	(4.9)	[2.5-7.3]
<i>Pneumocystis jiroveci</i> pneumonia	12	(3.7)	[1.6-5.8]
Disseminated MAC	12	(3.7)	[1.6-5.8]
Toxo. encephaliti	10	(3.1)	[1.2-5]
Crypto. meningitis	4	(1.3)	[0.1-2.5]
CMV retinitis	2	(0.6)	[0-1.4]
PML	1	(0.3)	[0-0.9]

表3. 配偶者の HIV 感染有無によって分けた男性 HIV 感染者の比較

		Partner's HIV status of male patients		p value
		Negative n=113 (45.8)	Positive n=66 (26.7)	
Age	Median [iqr]	33 [30-38]	31 [30-34]	0.010
Marriage history				
	Never	2 (1.8)	4 (6.1)	0.124
	Married	111 (98.2)	62 (93.9)	
Transmission route				
	IDU	68 (60.2)	31 (47.0)	0.086
	Non IDU	45 (39.8)	35 (53.0)	
Clinical Stage				
	1	29 (25.7)	21 (31.8)	0.773
	2	10 (8.9)	5 (7.6)	
	3	28 (24.8)	13 (19.7)	
	4	46 (40.7)	27 (40.9)	
CD4 count (μl)	Median[iqr]	89 [37-203]	97 [40-234]	0.935
HCV				
	Positive	75 (66.4)	31 (47.0)	0.006
	Negative	33 (29.2)	28 (42.4)	
	Not conducted	5 (4.4)	7 (10.6)	

しかし、後ろ向き研究では、両患者群、特に IDU 経験者と非経験者との間の性行動に関する情報がなく、配偶者の HIV 非感染と IDU 歴との相関が、性行動によるものかどうかについての検討ができなかった。そこで、平成 23 年 12 月から 3 月の間に同外来を受診した HIV 感染者およびその配偶者 150 名に対して、前向きにインタビューを行い性行動に関する情報を調査したところ(前向き研究については、平成 23 年 8 月に長崎大学熱帯医学研究所倫理委員会にて審査され承認済)、HIV 感染および非感染配偶者をもつ男性 HIV 感染者の性的接触回数の中央値 [Inter-quartile range, IQR]は、それぞれ 4 [4-8] 回/月、4 [3-8]回/月(いずれも、HIV 診断前の状況)であり、殆ど同じであることが判明した。また、どちらの群においても、大多数の性的接触にコンドームを使用していないことが判明し、コンドーム使用頻度が 0%と答えた割合が、配偶者の状態が感染群、非感染群で、それぞれ 77.2%, 82.9%であった。また、非常に興味あることに、HIV 非感染の配偶者をもつ男性 HIV 感染者の結婚歴は、有意($p = 0.004$)に長いことが判明した。

D. 考察

APOBEC3 群遺伝子多型と HIV-1 感染抵抗性やエイズ進行遅延との相関を実証するためには、複数の異なる集団において、その相関を示すことが必須である。本分担研究者は、長年北タイにおいて、HIV 感染者とその配偶者を対象にコホート研究を開発し、さらに宿主遺伝子多型研究や分子免疫研究に発展することに寄与してきた。今回、それらの経験を活かして、北ベトナムにおいて、同様のコホート集団を開発することができたことは、本分担研究の研究目的 2) である APOBEC3G 機能性多型と相関する APOBEC3 群遺伝子多型と HIV-1 感染抵抗性やエイズ進行遅延との相関を、タイ人以外のアジア人コホート集団を開発するための基盤を形成することに成功したと言える。

北タイにおける HIV 流行は、売春婦とその男性客がコアグループである。1990 年代初頭にまず売春婦の間で広まり、そこから男性客へ爆発的に拡大した。さらに、売春婦から感染した男性 HIV 感染者からその配偶者へ感染が伝播したのが、特徴である。一方、北ベトナムにおける HIV 流行は、IDU 集団がコアグループであり、IDU 歴のある男性 HIV 感染者からその配偶者へ異性間的接触により伝播するパターンが特徴である。

これまで、夫婦間 HIV 感染に関する研究の殆どは、性的接触により感染したインデックスケースからその配偶者への感染であり、IDU をインデッ

クスケースとする夫婦間 HIV 感染に関する研究発表はない。その意味において、我々のデータは新規性がある。特に、性的接触があるにもかかわらず HIV 非感染の割合が多かったことは、特徴的で、さらに配偶者の HIV 非感染とインデックスケースの IDU 歴との間に統計的に有意な相関があったことは、特筆すべきことである。前向き研究から、IDU 歴と性的活動レベルとの間に相関はなく、この差が IDU 患者の性行動によるものではないことが判明した。このことから、IDU によるインデックスケースのもつ HIV ウイルスのレセプター指向性に、例えばマクロファージに対して感染しにくい X4 タイプのウイルスの頻度が多いなどの偏りがある可能性がある。

今回、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、以上のことから、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、かなり長い間、相当の頻度 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な抵抗性を有する集団であると考えられた。従って、本年度の研究より、これらの HIV 暴露非感染集団は、本研究の目的 2) の第 2 の対象集団として適切である。

最後に、平成 23 年度は、APOBEC3G の機能的多型と HIV 感染抵抗性との相関を調べるための前実験として、APOBEC3 発現量と mRNA スプライシングパターンを評価する実験系を試みたが、まだ結果を出すに至っていない。一方、この実験系が確立した後に、平成 24 年度に予定している実際の検体を用いた実験に向けて、現地研究協力者との研究調整を行った。

E. 結論

APOBEC3 群遺伝子多型と HIV-1 感染抵抗性との相関を調べるための第 2 のアジア人対象集団を開発するために、北ベトナムバクマイ病院 HIV 外来に通院する HIV 感染者およびその配偶者を対象に後ろ向き調査研究を行った。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、また、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く、本研究目的 2) の対象集団として

適切であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

2) Rojanawiwat A, Tsuchiya N, Pathipvanich P, Pumpradit W, Schmidt WP, Honda S, Auwanit W, Sawanpanyalert P, Ariyoshi K. 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) 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.

2) 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..

3) 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。

4) 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。

5) 土屋菜歩、K Ruchawat, 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。

6) 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。

7) 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.

8) 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..

9) 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.

K. 知的所有権の出願・取得状況

該当するもの無し

ヒト APOBEC3 遺伝子の機能性多型の探索

研究分担者 木村 彰方（東京医科歯科大学難治疾患研究所 教授）

研究要旨 HIV 感染もしくは AIDS 発症の感受性・抵抗性を規定するヒト宿主要因の同定を目的として、日本人およびインド人集団における HIV/AIDS 関連多型の探索を行った。霊長類の比較ゲノム解析から *APOBEC3G* 遺伝子は旧世界ザルとヒト・チンパンジーでは異なる領域に選択圧がかかっていることが推定された。黒人集団において HIV/AIDS 抵抗性との関連が示されている *APOBEC3G* の H186R 多型は、旧世界ザルにおける進化選択領域に存在した。この H186R 多型について日本人およびインド人集団で HIV/AIDS との関連を検討したが、いずれにおいても有意な関連を認めなかった。一方、日本人およびインド人で *APOBEC3* 遺伝子のプロモーター領域を解析し、日本人で9か所、インド人で6か所（うち5か所は日本人にも共通）に多型を確認した。また、*APOBEC3G* 遺伝子近傍の連鎖不平衡を詳細に検討し、*APOBEC3F*、*APOBEC3G*、*APOBEC3H* 遺伝子がひとつの連鎖不平衡ブロックを形成することを明らかにした。ついで、この連鎖不平衡ブロック内の5か所のメチル化サイトについて日本人由来の B 細胞株を用いてメチル化の程度を検討したところ、メチル化の程度が細胞株ごとに大きく異なること、各部位のメチル化の程度には互いに関連性のないことを見出した。これらとは別に、白人および黒人集団で HIV/AIDS 抵抗性との有意な関連が報告されている HLA-C 遺伝子上流-35kb 多型 (rs9264942) および 3' UTR 多型 (rs67384697) を日本人およびインド人集団について検討したところ、-35kb 多型との関連は認められなかったが、3' UTR の del 多型は、白人・黒人集団とは逆に、インド人集団で HIV/AIDS 感受性と有意に関連することが判明した。

A. 研究目的

HIV 感染症は人類が新たに遭遇したウイルス感染症であり、無治療であれば大半の患者が免疫不全症である AIDS を発症する。しかしながら、HIV 感染ないし AIDS 発症の感受性・抵抗性には個体差があり、そこにはウイルス側の要因と宿主側の要因が関わる。一般にウイルスと宿主は相互に関連しながら進化を遂げるが、HIV も例外ではない。ウイルスゲノムの比較解析から、旧世界ザルの SIVmac が、チンパンジー内で変異を集積した SIVchz が約 120 年前にヒトに感染したものが HIV であると考えられている。一方、宿主側の要因を霊長類の進化と合わせて考えると、SIVmac は旧世界ザルと共存進化の関係にあり、チンパンジーは SIVcpz に感染するも比較的 AIDS に抵抗性である形質を進化的に獲得しているのに対し、ヒトは HIV の出現からそれほど時間が経っていないため、進化的な共存関係には至っていないと言える。このような進化学的な視点から HIV/AIDS 感受性・抵抗性の宿主要因を解明することは、新たな HIV/AIDS 治療ないし予防戦略をもたらす。

我々は HIV/AIDS 感受性・抵抗性を規定する

宿主要因を解明することを最終目的として、霊長類比較ゲノム解析による免疫・感染症関連遺伝子群における進化圧の検討を通じた候補遺伝子領域の選択、ヒト集団における候補遺伝子領域の多型探索と連鎖不平衡解析、および日本人およびインド人集団を対象にした HIV/AIDS 関連解析を行うことを本研究の目的とする。ことに、これまでの進化学的検討から霊長類の進化上選択圧がかかったことが明らかとなっている *APOBEC* 遺伝子群、HLA 遺伝子群、NK 細胞機能に関わる遺伝子群を解析の中心に据える。

B. 研究方法

1) *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。

2) *APOBEC3G* 遺伝子多型の関連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 exon 4 内

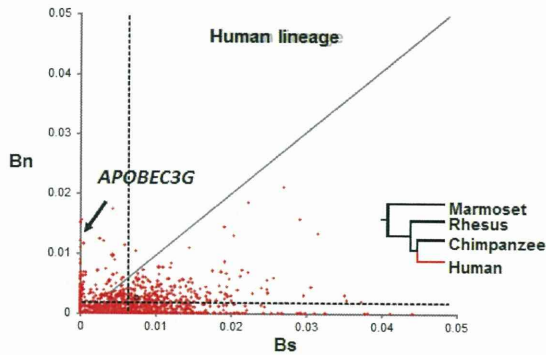


図1. ヒトにおける免疫・炎症関連遺伝子の進化 縦軸は Bn(非同義置換率)、横軸は Bs(同義置換率)を示す。霊長類における免疫・炎症関連遺伝子群の Bn, Bs の平均値を点線で示す。斜めの実線は $Bn/Bs=1$ を表すが、APOBEC3G は Bn/Bs が高く偏移している。

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 名を PCR-RFLP 法でタイピングした。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。

3) 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)をタイピングし、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 細胞株におけるメチル化の程度を評価した。

4) HLA-C および KIR3D 遺伝子領域の検討

HLA-C 遺伝子上流 35kb 多型(rs9264942)および 3'UTR 多型(rs67384697)を、日本人 HIV 感染後長期未発症患者(88~90 名)、日本人一般集団(268~281 名)、インド人 HIV 感染患者(233~249 名)、インド人一般集団(273~378 名)について PCR-RFLP 法を用いてタイピングし、患者-対照比較によって HIV/AIDS との関連を検討した。また、これらの対象中で KIR-3DL1 を有する者のうち、日本人 HIV 感染後長期未発症患者コホート 62 名、日本人一般集団 184 名、インド人 HIV 感染コホート 111 名、インド人一般集団 45 名について KIR-3DL1 アリルをダイレクトシーケンス法によってタイピングし、HIV/AIDS との関連を検討し

た。

【倫理面への配慮】

本研究に関わるヒトゲノム解析研究は、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ている。研究課題「HIV ウイルス感染防御機構の究明に関する研究」(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)

C. 研究結果

1) 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、図 1 に示すとおり、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 2 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、選択圧のかかる領域が異

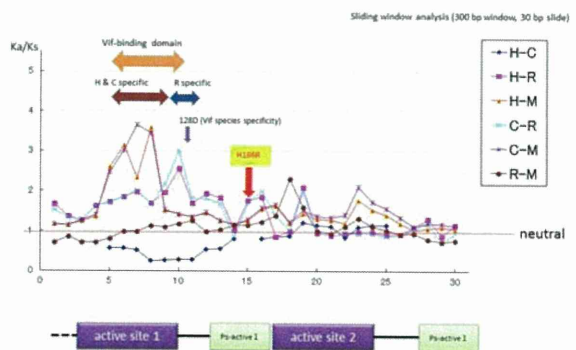


図2. 霊長類 APOBEC3G 遺伝子の進化選択圧 ヒト(H)、チンパンジー(C)、アカゲザル(R)、マーモセット(M)の APOBEC3G 遺伝子配列比較から 300bp ごとの Ka/Ks 比をプロットした。 $Ka/Ks=1$ (neutral)を赤点線で示す。また、Vif 結合ドメイン、ヒト・チンパンジー系列での選択領域、アカゲザルでの選択領域、および H186R の位置を図中に合わせて示した。

表1 APOBEC3G 遺伝子 H186R 多型と HIV/AIDS との関連

	日本人					インド人				
	患者(n=125)	対照(n=282)	OR	95% CI	p	患者(n=249)	対照(n=386)	OR	95% CI	p
遺伝子型頻度										
His/His	85.4%	87.6%				98.4%	96.9%			
His/Arg	14.6%	11.7%				1.6%	3.1%			
Arg/Arg	0.0%	0.7%				0.0%	0.0%			
アリル頻度										
His	0.927	0.934				0.994	0.975			
Arg	0.073	0.066	1.12	0.58-2.16	ns	0.006	0.025	0.51	0.16-1.60	ns
アリル陽性頻度										
His	100.0%	99.3%				100.0%	100.0%			
Arg	14.6%	12.4%	1.21	0.61-2.40	ns	1.6%	4.9%	0.51	0.16-1.60	ns

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。

2) APOBEC3G 遺伝子多型の探索と関連解析

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 患者—対照ともにはほぼ同定であり、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(表1)。

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2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(表2の右端)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、rs113187712、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。

3) 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3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3)について B 細胞株におけるメチル化の程度を検討したところ、表3に示す通り、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。

表2. APOBEC3G プロモーター領域多型

	rs4820366	rs117212415	rs113187712	rs113442814	rs12158029	rs55892921	rs619165	rs281921	rs619166	rs757463	H186R
population	G/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	C/C	A/G
Japanese	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	C/C	A/G
	G/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/A	G/G	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	C/T	C/C	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/G	G/A	C/C	C/A	C/C	A/A
	A/A	ND	ND	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	C/C	A/A
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	A/A	G/G	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
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	A/A	G/G	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	C/C	ND	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/G	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
	A/A	C/C	G/G	C/C	C/C	G/G	G/A	C/C	C/A	C/C	A/A

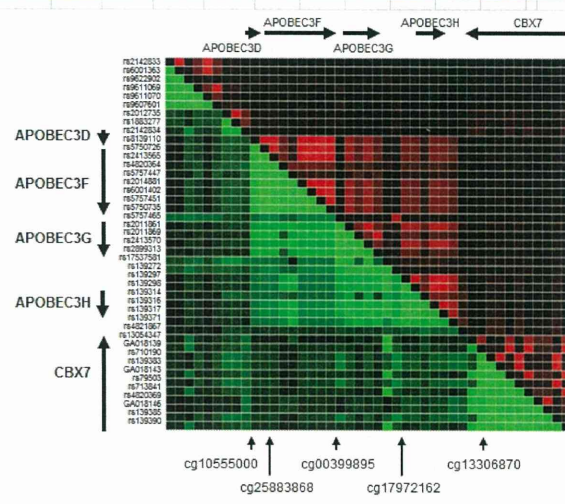


図3. APOBEC3 領域の連鎖不平衡ブロック構造 D' (右上)および r²(左下)を、高値ほど明るい色調となるように示した。領域内の遺伝子名と転写方向を矢印で示した。また、図の下には5か所の CpG サイトを示した。

表3. ヒト APOBEC3 領域内のメチル化

遺伝子領域	APOBEC3F		APOBEC3G	APOBEC3H	CBX7
メチル化	cg10555000	cg25883868	cg00399895	cg17972162	cg13306870
範囲	0.907-0.918	0.254-0.602	0.095-0.896	0.056-0.814	0.013-0.759
平均	0.885	0.406	0.502	0.301	0.228
標準偏差	0.021	0.054	0.233	0.185	0.205

ついで、*APOBEC3G* 遺伝子のそれぞれ上流および下流にある cg00399895 と cg17972162 のメチル化の程度を 2D 上にマップしたところ、これらの間に関連は認められなかった(図4)。

4) *HLA-C* および *KIR3D* 遺伝子領域の検討

欧米白人および黒人について、*HLA-C* 遺伝子上流 35 kb の多型(rs9264942、T>C)および *HLA-C* 遺伝子 3'UTR 多型(rs67384697、G>del)のそれぞれ C 型および del 型が、HIV 感染後の低ウイルス量および AIDS 発症抵抗性と関連することが報告されている。最近、rs9264942 が rs67384697 と強い連鎖不平衡にあること、rs67384697 は miR-148a 結合配列内にあり、del 型アリルは miR-148a との結合性が低く、その結果として *HLA-C* 分子の発現量が高く、このため HIV/AIDS 抵抗性を示すと報告されている。

そこで、これらの多型について、日本人およびインド人集団で HIV 感染者と一般集団の頻度を比較した(表4)。その結果、-35kb 多型は日本人、インド人いずれにおいても HIV/AIDS との関連は観察されなかった。これに対して、3'UTR 多型の解析では、日本人集団では関連が観察されなかったが、インド人集団では、白人や黒人集団

とは逆に、del 多型が HIV 感染感受性と有意な関連を示した。さらに、rs9264942 と rs67384697 との連鎖不平衡を検討したところ、日本人一般集団では $D' = 0.74$, $r^2 = 0.30$ と連鎖不平衡にあったが、インド人一般集団では $D' = 0.38$, $r^2 = 0.10$ と連鎖不平衡にはないことが判明した。

D. 考察

本研究で、*APOBEC3G* 遺伝子が進化的に霊長類において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 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 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 頻度は日本人、インド人ともに HIV 感染者一対照ではほぼ同程度であったことは、H186R が HIV 感染感受性には直接関連しないことを示唆した。

本研究によって APOBEC3 領域内の 3つの *APOBEC3* 遺伝子群が同一の連鎖不平衡ブロック内に存在することが判明した。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。すなわち、この領域と HIV/AIDS との関連を検討する上での重要な情報を与える。さらに興味深いことに、APOBEC3 領域内の CpG サイトのメチル化に大きな個体差があることが明らかになった。CpG サイトのメチル化は周辺遺伝子の発現性と密接に関連することが知られているため、今後 *APOBEC3* 遺伝子群の発現性と CpG サイトのメチル化、さらには当該領域の SNP と HIV/AIDS との関連を検討することで、APOBEC3 と HIV/AIDS との関連性を明らかにする予定である。

また、本研究では *HLA-C* 多型と HIV/AIDS との関連が、白人や黒人での報告とは全く異なっていることが明らかになった。ことに、*HLA-C* 遺伝子 3'UTR 多型の del 型がインド人集団で HIV 感染感受性と有意な関連を示したこと、インド人では当該領域の連鎖不平衡が白人や黒人とは大きく異なっていたことは、*HLA* 領域内の真の HIV/AIDS

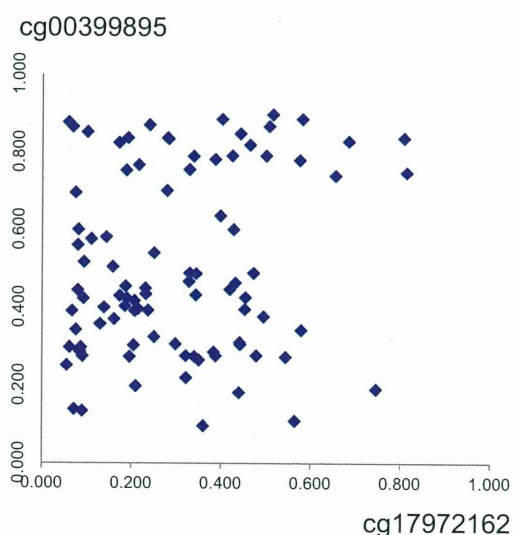


図4. B 細胞株における CpG サイトのメチル化 日本人由来の 93 種の B 細胞株について、cg00399895 (縦軸)と cg17972162 (横軸)のメチル化頻度を示す。